

**Das Genom des Equinen
Herpesvirus Typ 1 (EHV 1) Stammes
Rac H und seine Änderung
während der Attenuierung**

Carolin Schwend

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Das Genom des Equinen Herpesvirus Typ 1 (EHV 1) Stammes Rac H und seine Änderung während der Attenuierung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Carolin Schwend

aus
Schwäbisch Hall

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. D. Giesecke

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
2.	Schrifttum	6
2.1.	Equine Herpesviren	6
2.1.1.	Klassifizierung der Equinen Herpesviren vom Typ 1 (EHV 1)	6
2.1.2.	Entwicklung von Impfstoffen gegen EHV 1	8
2.2.	Molekulare Genetik bei EHV 1	9
2.2.1.	Aufbau des EHV 1	9
2.2.2.	Restriktionsenzymanalyse des EHV 1	9
2.2.3.	Genetische Varianz	10
2.3.	Virulenzmodelle	11
2.3.1.	Zelltropismus und Speziesspezifität	11
2.3.2.	Die genetische Basis der Virulenz	13
2.3.3.	Defekte Virusgenome	14
2.4.	Virulenzspezifische Genomänderungen	15
3.	Eigene Untersuchungen	17
3.1.	Material und Methoden	17
3.1.1.	Vermehrung des EHV 1	17
3.1.1.1.	Zelllinien und Virusstämme	17
3.1.1.2.	Plaquereinigung	17
3.1.2.	DNA-Isolierung	18
3.1.2.1.	Virus-DNA-Gradientenreinigung	18
3.1.2.2.	DNA-Schnellextraktion	19
3.1.3.	Restriktionsenzymanalyse	20
3.1.3.1.	Agarose Gel-Elektrophorese	20
3.1.3.2.	Polyacrylamid-Gel-Elektrophores	20
3.1.3.3.	Southern-Blot	22
3.1.3.4.	Isolierung einzelner DNA-Fragmente	23
3.1.3.5.	Nick Translation	23
3.1.3.6.	Hybridisierung	24

3.1.4.	Klonierung von DNA-Fragmenten	26
3.1.4.1.	Klonierung im Bakteriophagen Lambda	26
3.1.4.2.	Klonierung in pBR 322	29
3.1.5.	Überprüfung der Virulenz verschiedener Passagen des Stammes Rac H in Hamstern	33
3.1.5.1.	Virustitration	33
3.1.5.2.	Versuchsdurchführung	33
3.2.	Ergebnisse	34
3.2.1.	Veränderungen im Genoms des EHV 1-Stammes Rac H im Verlauf der Viruspassagierung	34
3.2.1.1.	Charakterisierung der DNA von Virusisolaten des EHV 1-Stammes Rac H nach verschiedenen Passagen mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen	34
3.2.1.2.	Überprüfung der Virulenz verschiedener Passagen des EHV 1-Stammes Rac H in syrischen Hamstern	39
3.2.1.3.	Charakterisierung der während der Viruspassagierung auftretenden Veränderungen im Genom des EHV 1-Stammes Rac H	39
3.2.2.	Physikalische Genkarte des EHV 1-Stammes Rac H	48
3.2.2.1.	Physikalische Genkarten der 12., 185. und 256. Passage des Stammes Rac H für Bam HI	48
3.2.2.2.	Physikalische Genkarten der 185. Passage des Stam- mes Rac H für Hind III und Sal I	56
4.	Diskussion	60
5.	Zusammenfassung	65
6.	Summary	66
7.	Literaturverzeichnis	67

1. Einleitung

Seit der Einführung molekularbiologischer Techniken in die Virologie haben sich die Möglichkeiten im Bereich der Epidemiologie und der Charakterisierung von Virusstämmen entscheidend verbessert.

Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen gelingt heute beim Equinen Herpesvirus vom Typ 1 (EHV 1) auch eine eindeutige Differenzierung von Subtypen, wie sie durch reine Serologie bisher nicht möglich war. Hybridisierungstechniken lassen Homologien im Genom verschiedener Viruspezies, wie auch Varianten innerhalb von Stämmen gleicher Spezies erkennen.

In der vorliegenden Arbeit sollten mit molekularbiologischen Methoden die Veränderungen im Genom des EHV 1-Stammes Rac H während seiner Attenuierung analysiert werden. Es sollten damit auch grundlegende Erkenntnisse darüber gewonnen werden, auf welche Weise sich der Virulenzverlust im EHV 1-Genom manifestiert. Derartige Erkenntnisse könnten eine Basis für die molekularbiologische Herstellung von Impfstoffen schaffen, die bei vollständiger Avirulenz des Impfvirus über sehr gute immunisierende Eigenschaften verfügen.

2. Schrifttum

2.1. Equine Herpesviren

2.1.1. Klassifizierung der Equinen Herpesviren vom Typ 1 (EHV 1)

In den dreißiger Jahren wurde die Virusgenese von seuchenhaft auftretenden Spätaborten und Totgeburten bei Pferden entdeckt (Dimock und Edwards, 1932). Es wurde allerdings noch kein Zusammenhang mit Erkrankungen des Respirationstrakts gesehen, die zu diesem Zeitpunkt noch als Influenza bezeichnet wurden. Der Zusammenhang konnte fast zehn Jahre später durch die Isolierung eines gemeinsamen Erregers aus einem abortierten Feten und einer Erkrankung des Atmungsapparats hergestellt werden (Manninger und Csontos, 1941). Es bestand jedoch noch die Ansicht, es würde sich hierbei um ein Influenzavirus handeln und Aborte würden nur sekundär nach respiratorischen Erkrankungen auftreten. Später stellte sich heraus, daß das Pferdeabortvirus mit dem Rhinopneumonitisvirus identisch war, sich aber deutlich vom Influenzavirus unterschied (Doll et al., 1954 a; 1954 b). Die Erreger von Abort und Rhinopneumonitis wurden nun zusammenfassend "Rhinopneumonitisvirus" genannt und von dem die "Pferdeinfluenza" verursachenden Influenzavirus abgegrenzt (Sovinova et al., 1958). Die Zugehörigkeit des Erregers zur Gruppe der Herpesviren wurde zu diesem Zeitpunkt zwar schon vermutet, konnte jedoch erst durch die Elektronenmikroskopie erwiesen werden (Plummer und Waterson, 1963).

Alle Rhinopneumonitisvirus-Stämme konnten einem Serotypen des Equinen Herpesvirus, dem Typ 1, zugeordnet werden (Burrows und Goodridge, 1972). In Anlehnung an die Einteilung des Herpes simplex Virus (HSV) in die Typen 1 und 2 wurde mit Hilfe des Kreuzneutralisationstests eine Differenzierung in die Subtypen 1 und 2 versucht (Shimizu et al., 1959). Der aus einem Feten isolierte Stamm H 45 wurde als Subtyp 1, der bei respiratorischen Erkrankungen isolierte Stamm Kentucky D als Subtyp 2 bezeichnet. Die Einteilung in diese beiden Subtypen wurde später auch bei anderen Isolaten vorgenommen (Mayr et al., 1965).

Burrows und Goodridge (1972) stellten einen Zusammenhang zwischen Pathogenese und Subtyp des Isolats her. Dem Subtyp 1 ordneten sie einen Großteil der Isolate aus abortierten Feten zu, dem Subtyp 2 dagegen fast alle Isolate aus Tieren mit respiratorischen Erkrankungen. Isolate vom Subtyp 1 besaßen ein weites Zellspektrum, die Fähigkeit zur Virämie

und zur Auslösung von Aborten. Isolate vom Subtyp 2 fehlten dagegen diese Fähigkeiten. Wie sich später zeigte, vermehrte sich der Subtyp 1 in den Epithelzellen des Respirationstraktes und in den Leukozyten des Blutes, während der Subtyp 2 sich nicht über den Respirationstrakt hinaus verbreitete (Patel und Edington, 1983).

Besondere Schwierigkeiten bereitete die Zuordnung von Isolaten aus dem zentralen Nervensystem (ZNS). Saxegaard (1966) beschrieb zum ersten Mal durch EHV verursachte Erkrankungen des ZNS, ebenfalls in Zusammenhang mit respiratorischen Erkrankungen und Aborten, bei Pferden in Norwegen. In den USA traten ZNS-Erkrankungen in der Regel als Spätfolge nach Aborten auf (Thein 1981). Die Erreger konnten jedoch nicht eindeutig einem Subtyp zugeordnet werden.

Den endgültigen Durchbruch bei der Typendifferenzierung brachte erst die Restriktionsenzymanalyse der genomischen Virus-DNA (Sabine, 1981; Studdert, 1983; Studdert et al., 1986; Turtinen, 1981). Studdert et al. (1981) konnten bei den Subtypen 1 und 2 nur wenige gemeinsame Restriktionsenzymschnittstellen finden und schlugen deshalb erstmals eine Umbenennung in zwei getrennte equine Herpesvirustypen vor. Hybridisierungsversuche der genomischen DNAs der beiden Subtypen durch Allen und Turtinen (1982), die eine Basensequenzhomologie von weniger als 20% erbrachten, bestärkten diese Forderung.

Mit Hilfe der Restriktionsenzymanalyse untersuchten Allen et al., (1983 b) 272 Isolate aus Aborten und 25 Isolate aus respiratorischen Erkrankungen. Die meisten dieser Isolate waren in Kentucky (USA) in der Zeit von 1960 bis 1982 isoliert worden. Die Untersuchungen zeigten, daß die Abortisolate zu über 90% dem Subtyp 1, die Isolate aus dem Respirationstrakt jedoch zu 86% dem Subtyp 2 zugeordnet werden konnten. Die Forderung nach der Unterteilung in zwei verschiedene Spezies wurde konkretisiert, wobei der Subtyp 1 als EHV 1, der Subtyp 2 als EHV 4 bezeichnet werden sollte. Infektionen mit EHV 1 verursachten Aborte und respiratorische Erkrankungen, solche mit EHV 4 blieben größtenteils auf den Respirationstrakt beschränkt. Die Arbeiten bestätigten außerdem, daß alle sechs bekannten Isolate aus ZNS Erkrankungen dem EHV 1 angehörten.

Die strenge klinische Unterteilung scheint jedoch nicht zuzutreffen. Daß Infektionen des ZNS sowohl durch EHV 1, als auch durch EHV 4 verursacht werden können, bewiesen Meyer et al. (1987) anhand von Restriktionsmustern der Isolate T952 (EHV 1) und T473 (EHV 4).

2.1.2. Entwicklung von Impfstoffen gegen EHV 1

Bald nach Erkennen einer Virusinfektion als Abortursache wurden Versuche unternommen, Impfstoffe zu entwickeln. Es war auch die Beobachtung gemacht worden, daß sich besonders schwere Abortfälle in solchen Beständen ereigneten, in denen zuvor keine respiratorischen Erkrankungen aufgetreten waren. Daraus konnte geschlossen werden, daß nach einer überstandenen Infektion des Atmungstrakts ein ausreichender Schutz auch gegen den Virusabort entstanden war.

Doll und Bryans (1963) entwickelten aus einem hamsteradaptierten Feldvirus, das aus einem Feten isoliert worden war, einen Lebendimpfstoff, der in den USA in einem sogenannten "geplanten Infektionsprogramm" eingesetzt wurde. Die Abortrate konnte jedoch nur in einigen Beständen der Gesamtpopulation reduziert werden (Bryans, 1981). Ein weiterer Nachteil war in der Restvirulenz des Impfvirus zu sehen. Wie sich später herausstellte, war das Impfvirus sehr wahrscheinlich an 15% aller bis 1979 aufgetretenen Stutenaborte beteiligt (Allen et al., 1983b; Bryans, 1981).

Ab 1979 wurde in den USA ein neuer Impfstoff aus dem formalin-inaktivierten, hochvirulenten Stamm A 183 eingesetzt (Moore und Koonse, 1977; Bryans, 1981; Bryans und Allen, 1981). Die Abortrate sank in der Gesamtpopulation von 7,4 auf 2,9 von 1000 trächtigen Stuten, wobei 65% der Tiere geimpft waren (Bryans und Allen, 1984).

In Europa entwickelten Mayr et al. (1968) einen Impfstoff aus einem attenuierten Virustamm mit stark abgeschwächter Virulenz bei vollständig erhaltener Immunogenität. Ausgangsmaterial war der Virusstamm Rac H, der in Polen aus einem abortierten Pferdefetus über Goldhamster isoliert worden war (Mayr et al., 1965). Die Attenuierung erfolgte durch Passagen in primären Schweinenieren-Zellkulturen. Die Virulenz-Prüfung des Impfstoffes wurde zunächst an Goldhamstern, dann an Fohlen und nicht-tragenden Stuten, später an tragenden Stuten vorgenommen. Schon ab der 105. Passage löste das Impfvirus bei Fohlen und tragenden Stuten keine Krankheiterscheinungen mehr aus. Bei gleich guten immunisierenden Eigenschaften wurde Virusmaterial der 256. Passage als Impfstoff bevorzugt, da dieses sich auch bei Hamstern als nicht mehr virulent erwies. Heute sind in der BRD zwei Impfstoffe auf dem Markt: ein Lebendimpfstoff (Prevaccinol) aus dem attenuierten EHV 1-Stamm Rac H und ein Kombinationsimpfstoff (Resequin), der den attenuierten Stamm Rac H in inaktiver Form enthält.

2.2. Molekulare Genetik bei EHV 1

2.2.1. Aufbau des EHV 1

Das equine Herpesvirus ist ein typischer Vertreter der alpha-Herpesviren (Rolle und Mayr, 1984). Das Virion hat einen Gesamtdurchmesser von 120-200 nm und ein Molekulargewicht von 1×10^9 Dalton. Die Dichte im CsCl-Gradienten liegt bei 1,27-1,29 g/cm³. Es besteht aus einem Core, das die DNA enthält und zusammen mit dem Kapsid das Nukleokapsid bildet. Dieses hat einen Durchmesser von etwa 100-110 nm, trägt 162 hohlzylindrische Kapsomeren, die ikosaedrisch angeordnet sind und zeigt 2-, 3- und 5-fach Symmetrie (O'Callaghan, 1978). Diese Struktur ist umgeben von einer Hülle aus zwei Schichten. Die äußere Schicht ist mit Projektionen besetzt, die innere Schicht stammt von der Kernmembran der Zelle. Zwischen dem Kapsid und der Hülle ist eine Lipoproteinschicht zu finden, die dem Kapsid lose aufliegt. Sie wird als Tegument bezeichnet und hat bei den verschiedenen Vertretern der Herpesvirusfamilie unterschiedliche Größen (Roizman und Furlong, 1974).

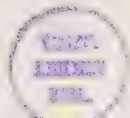
Das Genom des EHV 1 besteht aus einer doppelsträngigen DNA. Soehner et al. (1965) fanden ein Molekulargewicht von ca. 93×10^6 Dalton, eine Basenzusammensetzung von 56% G und C und eine Dichte im CsCl-Gradienten von 1,716 g/cm³.

2.2.2. Restriktionsenzymanalyse des EHV 1

Restriktionsendonukleasen sind Teil eines bakteriellen Systems zum Schutz vor Fremd-DNA. Wird eine Bakterienzelle durch Bakteriophagen infiziert, können Adsorption und Penetration zwar stattfinden, jedoch wird die eingedrungene Nukleinsäure durch die Endonukleasen der Wirtszelle hydrolysiert. Es sind heute ca. 250 verschiedene Restriktionsendonukleasen bekannt.

Die Rolle der Restriktionsenzymanalyse bei der Klassifizierung von EHV 1 wurde im Abschnitt 2.1.1. dargestellt. Die früher als Subtypen 1 und 2 des EHV 1 bezeichneten Herpesviren konnten erst durch Vergleich des Genoms eindeutig in die Typen 1 und 4 unterschieden werden.

Henry et al. (1981) und Whalley et al. (1981) erstellten physikalische Genkarten des EHV 1. Danach läßt sich das Genom in eine unique long (U_L) Region von ca. 71,6 MD und eine unique short (U_S) Region von ca. 6 MD unterteilen. Die U_S Region ist am freien Ende (TR_S oder free s region terminus) und am internen Ende (IR_S oder internal terminus) von



jeweils einer "inverted repeat" Sequenz von ca. 7 MD begrenzt. Die insgesamt ca. 20 MD große "short region" (S-Region) kann daher in zwei Orientierungen vorliegen. Es entstehen zwei Isomere in einer molekularen Verteilung von je 50%.

Whalley et al. (1981) fanden eine U_L Region von ca. 74 MD, eine U_S Region von ca. 7,9 MD und inverted repeat Regionen größer als 5,6 MD aber kleiner als 8,7 MD Größe.

Baumann et al. (1987) beschreiben außerdem einen heterogenen Bereich repetitiver Sequenzen (het Region) in der U_L Region, nahe der inverted repeat Region bei map unit 0,70-0,75.

2.2.3. Genetische Varianz

Das EHV 1 zeigt eine relativ geringe genetische Varianz. Wie in Abschnitt 2.1.1. beschrieben, wurden von Allen et al. (1983 b) Isolate aus Aborten und respiratorischen Erkrankungen in Kentucky analysiert. Die Isolate konnten zwar nach ihrem Restriktionsenzymmuster den EHV Typen 1 bzw 4 zugeordnet werden, jedoch fiel bei den EHV 1 Isolaten eine wesentlich geringere Heterogenität als bei den EHV 4 Isolaten auf. Die 272 EHV 1 Isolate hatten 16, die nur 25 Isolate vom Typ 4 bereits 13 verschiedene Muster (Elektropherotypen). Das EHV 1 mit dem Muster 1P war von 1960 bis 1972 für fast 90% der Aborte verantwortlich. Danach wurde eine Änderung der Prävalenz ohne bekannte Ursache festgestellt. Der Elektropherotyp 1B war von 1972 bis 1980 zu 50% beteiligt (Allen et al., 1986). Im Vergleich dazu besitzt das HSV 1 eine wesentlich ausgeprägtere genetische Varianz. Bei 80 Isolaten war eine Variabilität in 38% der Schnittstellen zu finden.

Die von Allen et al. (1983 b) untersuchten Isolate waren maximal über 8 Zellkulturen aus equinen Zellen passagiert. Der EHV 1-Stamm Kentucky D erwies sich jedoch nach häufigem Passagieren über Kanninchennierenzellen als nicht mehr identisch mit dem Ausgangsisolat. Allen et al. (1983 a) führten daraufhin mit verschiedenen EHV 1-Stämmen bis zu 100 Passagen in equinen Zellen und parallel dazu in heterologen Zellen durch. Sie verglichen die isolierte DNA außerdem mit DNA von Stämmen, die aus Pferden isoliert worden waren. Die Restriktionsenzymmuster der in heterologen Zellen vermehrten Stämme waren stark verändert, sicherlich auf Grund eines Verlusts oder eines Hinzukommens von DNA-Sequenzen bzw Schnittstellen. Auch Studdert et al. (1986) beschrieben eine derartige Heterogenität des Genoms bei Passagen auf heterologen Zelllinien.

Auch beim Vergleich der beiden bekannten physikalischen Genkarten des EHV 1 (Henry et al., 1981; Whalley et al., 1981) sind Differenzen erkennbar, die vermutlich in der unterschiedlichen Passagierung des Virusmaterials begründet sind. In 5 bis 6 verschiedenen Fragmentgrößen stimmen die beiden Karten nicht überein (Allen und Bryans, 1986). Henry et al. (1981) benutzten einen hochpassagierten, an heterologe Zellen (Mäusefibroblastenzellen) adaptierten Stamm, Whalley et al. (1981) dagegen ein niedrig passagiertes (Babyhamster Nierenzellen) Feldisolat.

2.3. Virulenzmodelle

Alle bisher angebotenen Impfstoffe werden bislang in ihrer Wirksamkeit angezweifelt. Um neue Impfstoffe entwickeln zu können, ist es unerlässlich, den molekularen Mechanismus der Erkrankung genauer zu untersuchen. Da spezifische Virulenzmodelle für EHV nicht existieren, müssen entsprechende Modelle anderer Viren herangezogen werden.

2.3.1. Zelltropismus und Speziesspezifität

Zelltropismus und Speziesspezifität eines Virus werden meist durch spezifische Rezeptoren auf Zelloberflächen, die zum größten Teil Glykoproteine darstellen, vermittelt. Die genaue Funktion solcher Rezeptoren ist noch nicht bekannt.

Die Virusadsorption in der Initialphase ist reversibel und nur von kurzer Dauer. Nur dann, wenn eine spezifische Affinität zwischen Rezeptor der Zelle und Anti-Rezeptor des Virus besteht, entsteht eine irreversible Bindung durch enzymatische Veränderungen an der Virusoberfläche, worauf dann die Penetration des Virus erfolgen kann (Lit. bei Rolle und Mayr, 1984).

Die Empfänglichkeit einer Zelle ist limitiert durch die Anzahl der spezifischen Rezeptoren. Nicht alle Zellen bzw. Gewebe in einem empfänglichen Organismus besitzen Rezeptoren für ein entsprechendes Virus. Es können auch bei verschiedenen Zelltypen mehrere unterschiedliche Rezeptoren für das gleiche Virus existieren (Kauffman et al., 1983).

Intrazelluläre Mechanismen spielen oft keine Rolle. Für Polioviren wurde nachgewiesen, daß die Virusvermehrung schon an der Zelloberfläche verhindert werden kann. Durch Transfektion, also Infektion mit Poliovirus-Genom von Mäuszellen, welche normalerweise nicht empfänglich für dieses Virus sind, wurden infektiöse Viruspartikel gebildet, die wiederum

nur das ursprüngliche Wirtsspektrum der Polioviren besitzen (Holland et al., 1959).

Von spezifischen Zellrezeptoren unabhängig sind Infektionen mit verschiedenen Paramyxoviren. Das Sendai-Virus erhält nur durch proteolytische Spaltung des Hüll-Glykoproteins F volle Infektiosität (Scheid et al., 1974). Ein ähnlicher Mechanismus existiert beim Influenzavirus A und B, bei dem das Hämagglutinin proteolytisch gespalten werden muß (Lazarowitz et al., 1975). Es besteht demnach ein Tropismus für Gewebe mit ausreichender Aktivität bestimmter proteolytischer Enzyme. Entsprechende Mechanismen sind bei Herpesviren nicht bekannt.

Die Speziespezifität bei Herpesviren ist variabel. Das Pseudorabiesvirus (Aujeszky'sches Virus des Schweines) hat ein relativ weites Wirtsspektrum, nur Primaten und Einhufer besitzen eine gewisse Resistenz (Rolle und Mayr, 1984). Das EHV 1 bleibt nicht auf Pferde beschränkt. Isolate aus einer Antilope und aus drei abortierten Rinderfeten konnten über die Restriktionsenzymanalyse eindeutig als EHV 1-Abkömmlinge identifiziert werden (Chowdhury et al., 1986). Die bovinen Isolate wiesen nur geringfügige Unterschiede gegenüber dem EHV 1 Genom auf. Beim Antilopen-Isolat war ein Teil der entsprechenden Fragmente verlorengegangen bzw neue Fragmente hinzugekommen. Einige Fragmente ließen eine veränderte Mobilität erkennen. Die Veränderungen traten am rechten und linken Genomende und am U_L/U_S -Übergang auf. Auch beim Pseudorabiesvirus fand man nach Passagen auf heterologen Zellkulturen eine Variabilität von DNA-Fragmenten hauptsächlich im U_S -Bereich des Genoms (Lomicz et al., 1984).

Die Adaption des EHV 1 an nicht-equine Wirtsspezies hatte also offensichtlich Veränderungen im Genom zur Folge. Diese Tatsache ist auch, wie in Abschnitt 2.3.3. beschrieben, bei der Passage auf Fremdzellen zu beobachten.

In Zellkulturen besitzt das EHV 1 keine besondere Spezifität. Es kann sowohl auf equinen, als auch auf nicht-equinen Zellen vermehrt werden (siehe Abschnitt 3.1.1.). Dies scheint seinen in vivo-Eigenschaften zu entsprechen und kommt in einer genetischen Instabilität zum Ausdruck. Beim HSV konnten die für Speziespezifität bzw Organotropismus verantwortlichen Gene im Genom lokalisiert werden (Rösen et al., 1985; 1986). Der HSV-Stamm HFEM war bei intrazerebraler Inokulation apathogen, bei intraperitonealer Inokulation jedoch pathogen für Tupaia. Nach "marker rescue" Experimenten mit einer Deletionsmutante von HFEM erwies sich ein Bereich zwischen map unit 0,762 und 0,789 in der IR Region als für den Verlust der i.p. Pathogenität verantwortlich. Die Rekombinante,

der dieser Bereich wieder eingefügt worden war, war jedoch nicht pathogen für Mäuse. Die Ausprägung der Neurovirulenz in Mäusen wurde einer Region zwischen map unit 0,71 und 0,83, also in der IR-Region, zugeordnet (Javier et al., 1987).

Der Versuch einer Differenzierung der EHV 1-Stämme über Zelltropismus aufgrund von Plaquebildung in Mäusefibroblasten (L+ bzw L-Charakter) erbrachte keine befriedigenden Ergebnisse (Borgen, 1972; Klingeborn und Dinter, 1972). Die untersuchten EHV-Stämme besaßen auf unterschiedlichen L-Zell-Klonen nicht den gleichen L-Charakter, was für die Ausprägung weiterer, jedoch nicht mit dem Zelltropismus korrelierender Spezifitäten spricht. Diese Eigenschaften ließen sich nur schwer mit den Virulenzeigenschaften der untersuchten EHV 1-Stämme in Übereinstimmung bringen.

2.3.2. Die genetische Basis der Virulenz

Unter Attenuierung versteht man eine Selektion von Virusmutanten, mit dem Ziel einer Abschwächung der Virulenz bzw eines vollständigen Virulenzverlusts des Erregers bei erhaltener Immunogenität. Da durch die Attenuierung für die Virulenz verantwortliche Gene möglicherweise verloren gehen, wurden zahlreiche Versuche unternommen, diese Gene im viralen Genom zu lokalisieren.

Folgende Methoden werden zum Vergleich von virulenten und avirulenten Virusstämmen angewandt:

- Restriktionsenzymanalyse der viralen DNA zur Bestimmung von Anzahl und Größe der DNA-Fragmente
- Isolierung von unterschiedlichen DNA-Fragmenten und Hybridisierung mit der DNA anderer Stämme, um Lage und Veränderungen der Fragmente im Genom darzustellen
- “Marker Rescue”: ein avirulentes Virus wird durch Rekombination mit einem bestimmten Restriktionsenzym-Fragment eines virulenten Virus wieder virulent (Lomniczi et al., 1984; 1987 a, b; Rösen et al., 1986)
- Sequenzierung des Genoms zur Aufklärung von Organisation und Veränderungen in Struktur- und regulativen Genen

2.3.3. Defekte Virusgenome

Herpesviren produzieren häufig defekte Genome in Form von defective interfering particles (DIPs). Diese enthalten ausgedehnte Deletionen, aber auch Rekombinationen verschiedener Genomabschnitte sowie Regionen wiederholter Sequenzabschnitte.

Den DIPs, die bei DNA- und RNA-Viren auftreten, fehlen notwendige Gene zur autonomen Replikation oder Reifung in der Wirtszelle (Holland, 1985). Die Deletionen umfassen bis zu 90% des ursprünglichen Virusgenoms. Es fehlen außerdem Gene für wichtige Strukturproteine bzw Antigene. Oft sind die DIPs biologisch vollständig inaktiv und benötigen ein homologes Helfervirus zur Vermehrung. Im Genom der DIPs müssen jedoch mindestens zwei Sequenzen obligat vorliegen :

- 1) Die Erkennungssequenz für die virale Replikase, um die Replikation zu starten.
- 2) Die Erkennungssequenz für die Verpackung des defekten Genoms in ein Kapsid.

DIPs können als monomere oder konkatemere Strukturen vorgefunden werden. Um ein stabiles Virion auszubilden, muß das defekte Genom außerdem in einer Mindestgröße vorliegen. Nur solche DIPs, die in etwa die Größe des vollständigen Virusgenoms erreichen, können mit einem Kapsid umgeben ins Zytoplasma abgegeben werden (Vlazny, 1982). Sie stellen dann infektiöse Viruspartikel dar. Auch die defekte, nicht verpackte DNA kann nach Freiwerden aus dem Zellkern infektiös sein.

Die Ursache für die Entstehung von DIPs wird darin vermutet, daß sich bei der Transkription die Replikase irgendwann vom parentalen Strang ablöst und an einer anderen Stelle bzw gar nicht mehr ansetzt (Perrault, 1981).

Folgende biologische Rollen der defekten Virusgenome werden diskutiert (Holland, 1985):

- Gen-Transduktion bei Säuger- oder Bakterienzellen
- Gen-Konversion bei Bakterien durch Bakteriophagen
- Transformation von Zellen durch virale Gene

- Schutz vor Erkrankung gegen Infektionen mit homologem Virus durch attenuierende Funktion der DIPs
- Viruspersistenz
- Evolutorische Veränderungen von Viren
- Evolutorische Bedeutung für Wirtszellen

Defekte Virusgenome können die Vermehrung von kompletten Viruspartikeln beeinträchtigen. Bei homologen Doppelinfektionen werden sie in Anwesenheit von Helferviren vermehrt. In manchen Fällen geschieht dies auf Kosten der Helferviren, die dabei in wesentlich geringerer Zahl gebildet werden als die defekten Virusgenome.

Um in Zellkulturen die Bildung von DIPs zu vermeiden, muß mit niedrigen Virusdosen (low multiplicity of infection oder low MOI) angeimpft werden (Holland, 1985). Um DIPs also weitgehend zu eliminieren, müssen diverse Plaquepassagen, direkt von Plaque zu Plaque durchgeführt werden. Um eine große Ausbeute an DIPs zu erzielen, muß mit einer hohen MOI bzw mit unverdünnten Passagen angeimpft werden.

Hauptbestandteil der DIPs beim EHV 1 sind aneinandergereihte Sequenzen aus der inverted repeat Region (Baumann et al., 1987), deren Bedeutung u. a. darin besteht, daß dort die Gene für die sogenannten immediate early (IE) Proteine lokalisiert sind. Weiterhin enthalten sie Regionen aus dem L-Terminus des EHV 1 Genoms (map unit 0,01 bis 0,04), Regionen aus dem linken Ende des L-Terminus (0,0 bis 0,01) und Sequenzen aus einer variablen Region im unique long Teil des Genoms. Gray et al. (1987) fanden heraus, daß DIPs Deletionen zwischen map unit 0,80 und 0,83 der inverted repeats aufweisen, ein Großteil der IE-Sequenzen ist also verloren gegangen. Dieser Verlust von IE-Sequenzen hat vermutlich eine fehlerhafte Transkription bzw Genregulation zur Folge. Damit könnte auch eine Bedeutung von DIPs bei der Entstehung von Viruspersistenz und onkogener Transformation erklärt werden (Dauenhauer et al., 1982).

2.4. Virulenzspezifische Genomänderungen

Die Genome von equinem Herpesvirus, Pseudorabies Virus und Herpes simplex Virus vom Typ 1 sind ähnlich organisiert. Erkenntnisse über die beiden letztgenannten Virusarten finden also auch begrenzt Anwendung beim equinen Herpesvirus.

Bei verschiedenen Stämmen des Pseudorabies Virus (PRV) konnte ein Virulenzverlust auf Deletionen in deren Genom zurückgeführt werden (Lomniczi et al., 1984; 1987 a; Mettenleiter et al., 1987). So fanden Lomniczi et al. (1984; 1987 a) bei ihren Arbeiten mit den attenuierten PRV-Impfstämmen Norden und Bartha in der U_s Region Deletionen von ca. 4 Kbp. Durch "marker rescue" und Rekombinations-Experimente zeigten sie aber auch, daß die Virulenz bei einigen PRV Stämmen multi-genisch kontrolliert wird. Der Stamm Bartha ist in mindestens 2 Bereichen defekt. Ein anderer Stamm, Buk Z900, in mindestens 3 Bereichen. Der Impfstamm Tatarov ist nur im Thymidin-Kinase Gen defekt (TK-).

Beim HSV 1 konnte die exakte Position der Deletion festgestellt werden, die den Virulenzverlust bewirkt. Sie umfaßt ca. 4,1 Kbp und liegt bei map unit 0,762-0,789, im IRL-Bereich (Rösen et al., 1985; 1986).

Über EHV 1 ist in diesem Zusammenhang von Chowdhury et al. (1985) berichtet worden. Die aus milden respiratorischen Erkrankungen isolierten Stämme NM3 und SL-D zeigten eine geringe Virulenz. Im Restriktionsenzymmuster (Spaltung mit dem Enzym Bam HI) war ein Verlust der Banden L und M/N, die auch bei dem avirulenten EHV 1-Impfstamm Rac H fehlen, nachzuweisen. Bei Rac H und SL-D trat dafür eine neue Bande (2,5 MD), bei NM3 traten zwei neue Banden (2,95 MD, 2,50 MD) auf. Ähnlich dem PRV treten auch beim EHV 1-Stamm Rac H weitere Veränderungen im S-Segment des Genoms auf. Es stellte sich die Frage, ob der EHV 1-Stamm Rac H in diesem Bereich Deletionen aufweist oder ob Motilitätsänderungen der DNA-Fragmente bei gleicher Gesamtgröße auftreten. Von Interesse ist auch, wann diese Veränderungen während der Passage auf Fremdzellen aufgetreten sind und wie sich das Virulenzverhalten während dieser Passagen ändert.

In dieser Arbeit sollten beim EHV 1-Stamm Rac H diejenigen Bereiche im Genom bestimmt werden, die im Verlauf der Attenuierung Veränderungen erfahren haben. Für die 12., 185. und 256. Passage des Stammes Rac H sollten physikalische Genkarten erstellt werden, um die Lage der veränderten Fragmente im Genom darzustellen. Zusätzlich sollte der Virulenzverlust bei den einzelnen Passagen in vivo überprüft werden.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Vermehrung des EHV 1

3.1.1.1. Zelllinien und Virusstämme

Material:

RK₁₃ (Kaninchennierenzelllinie) in Medium 199 mit Antibiotika-Zusatz (100000 I.E./l Penicillin, 0,1 g/l Streptomycin) und 5% Fetalem Kälberserum (FKS) bzw Basalmedium Supplement (BMS) (Fa. Biochrom, Berlin)

EEL (sekundäre equine embryonale Lungenzellen) in Minimum Essential Medium mit Zusatz von Earle Salzen (EMEM, mit 10% FKS bzw BMS und Antibiotikazusatz) und angereichert mit nichtessentiellen Aminosäuren (Fa. Biochrom)

Zur Verfügung stand Zellkulturmaterial des Virusstammes Rac H nach der 12., 185. und 256. Passage über embryonalen Schweinenierenzellen (ENS). Die beiden niedrigpassagierten Virusstämme (12. P., 185. P. ENS) wurden auf EEL, der hochpassagierte (256. ENS) auf RK₁₃ vermehrt. Die Virusernte erfolgte nach 2 bis 4 Tagen bei einem cytopathischen Effekt (cpE) von 80-90% durch zweimaliges Gefriertauen der Kultur bei -20 °C, um die größtenteils zellgebundenen Virionen freizusetzen.

3.1.1.2. Plaquereinigung

Material:

Zellkulturschalen (8-Loch 26 x 33 mm; Fa. Miles)

0,8% Carboxymethylcellulose (high viscosity, Fa. Sigma, München) in EMEM mit 5% FKS

Färbelösung: 5% Kristallviolett in 9% Formalin

Virusmaterial wurde 10^{-4} , 10^{-5} und 5×10^{-6} verdünnt auf konfluente equine embryonale Lungenzellen ausgesät, mit Carboxymethylcellulose überschichtet und 3 bis 5 Tage in 5% CO₂ Atmosphäre bei 37 °C bebrütet. Dann wurden solche Plaques markiert, die von Nachbarplaques mehr als ein doppeltes Blickfeld entfernt waren. Die Entnahme der einzelnen Plaques für die Vermehrung in EEL-Zellkultur Röhrchen erfolgte mit einer

sterilen Pasteurpipette. Die Platte wurde zur Kontrolle mit 2 ml Kristallviolett pro Loch und 2 Min. Einwirkungszeit gefärbt und die Plaques ausgezählt. Es sollten nicht mehr als 10 Plaques pro Loch in der zur Isolierung verwendeten Verdünnungsstufe vorhanden sein.

3.1.2. DNA-Isolierung

3.1.2.1. Virus-DNA-Gradientenreinigung

3.1.2.1.1. Virusreinigung über Sucrosegradienten

Material:

TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA), autoklaviert
20% und 60% Sucrose (w/w) in TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4), autoklaviert

Die nach zweimaligem Gefriertauen des Zellkulturmaterials freigesetzten Viruspartikel wurden niedrigtourig (500 g) vorgereinigt und mittels Ultrazentrifugation (30 Min. bei 40000 rpm im 45 TI Rotor, Fa. Beckman, München) pelletiert. Nach Ultrabeschallen des resuspendierten Pellets erfolgte durch nochmalige niedrigtourige Zentrifugation eine Trennung in unlösliche Aggregate und Virussuspension. Der Überstand wurde vorsichtig auf einen 20-60% Sucrosegradienten (in SW 40-Röhrchen der Fa. Beckman, München) aufgetragen und 100 Min. bei 40000 rpm im SW 40 Rotor zentrifugiert. Das als sichtbare Bande erscheinende Virusmaterial konnte durch Punktion entnommen und nach Verdünnung in TE 80 Min. bei 40000 rpm im SW 40 Rotor entzuckert werden.

3.1.2.1.2. Cäsiumchlorid-Dichte-Gradient zur Isolierung der viralen DNA

Material:

20% SDS (w/v) in H_2O
30% Sarcosyl (w/v) in H_2O
CsCl 150 g in 90 ml TE (pH 7,4), autoklaviert
Proteinase K (Fa. Sigma) 1 mg/ml (w/v) in 1,5 mM $CaCl_2$
Ethidiumbromid 10 mg/ml H_2O
Paraffin, flüssig
1-Butanol, TEN-gesättigt (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,15 M NaCl)

Dialyseschläuche (Fa. Serva, Heidelberg)
3 M Natriumacetat (pH 4,8)
Ethanol (absolut bzw 70%)
TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4)

Nach Resuspendieren des entzuckerten Viruspellets in 1,6 ml TE und 10-minütiger Vorbehandlung mit 50 µl SDS und 30 µl Sarkosyl erfolgte die Lysis der Virionen durch dreistündige Inkubation mit 0,5 ml Proteinase K-Lösung. Die klare Flüssigkeit wurde in 11 ml-Ultrazentrifugenröhrchen für den 70.1 TI Rotor (Fa. Beckman) überführt, mit 7 ml CsCl-Pufferlösung gemischt, mit Paraffin aufgefüllt, austariert und nach Zugabe von 0,15 ml Ethidiumbromid verschlossen. Nach Aufbau des CsCl-Gradienten durch 48-stündige Zentrifugation bei 42000 rpm konnten die unter UV Licht sichtbar gemachten DNA-Banden durch Punktion entnommen und in silikonisierte Röhrchen überführt werden. Nach Entfernen von Ethidiumbromid und CsCl mit Butanol und dreimaligem Dialysieren gegen TE (jeweils 8 Stunden) erfolgte die DNA-Fällung durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat und doppeltem Volumen absoluten eiskalten Ethanols über Nacht bei -20 °C. Nach zweimaligem Waschen mit 70% Ethanol und Vakuumtrocknen wurde das Pellet in TE resuspendiert.

3.1.2.2. DNA-Schnellextraktion

Material:

TEN (100mM Tris, 10mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7,2), steril filtriert

neutralisiertes Phenol:

bei 68 °C geschmolzenes Phenol wurde nach Zugabe von 0,1% 8-Hydroxychinolin nacheinander mit dem gleichen Volumen

1 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) und 2 mal mit TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) mit 0,2% β-Mercaptoethanol ausgeschüttelt bis der pH auf 8,0 eingestellt war. Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

IAC (1 Teil Isoamylalkohol und 25 Teile Chloroform)

200 µl infizierte Zellsuspension wurden mit 50 µl TEN, 50 µl Proteinase K und 22,5 µl 20% SDS versetzt, 3-5 Min. kräftig geschüttelt und 30 Min. bei 56-60 °C lysiert. Die Proteine wurden 2 mal mit Phenol und 1 mal mit IAC extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt, wie in Abschnitt 3.1.2.1.2. beschrieben.

3.1.3. Restriktionsenzymanalyse

3.1.3.1. Agarose Gel-Elektrophorese

Material:

Flachbett-Elektrophorese-Gerät (Gelfläche 200 x 200 mm;
Fa. Pharmacia, Freiburg)
Stromversorgungsgerät (Fa. Pharmacia, Freiburg)
UV-Transilluminator
Sofortbild-Kamera mit Rotfilter (Fa. Polaroid)
Polaroid-Film Typ 667 (ohne Negativ) und Typ 665 (mit Negativ)

50 x EP (50-fach konzentrierter Elektrophorese-Puffer): 2 M Tris, 0,05 M EDTA, 0,25 M Natriumacetat, in H₂O. Mit 1 Mol/l HCl auf pH 7,8 eingestellt.

1 x EP (50 x EP 1:50 mit H₂O verdünnt) als Laufpuffer

Agarose (Fa. Seakem, Marine Colloids) in 1 x EP

Ethidiumbromid (Fa. Sigma, München) 10 mg/ml H₂O Stammlösung

Stop-Puffer: 10 x BSE (0,5 M EDTA, 5 g Sucrose, 0,5 g SDS, 0,025 g Bromphenolblau)

Restriktionsendonukleasen mit spezifischen Pufferlösungen (REact-Buffer, Fa. BRL, Eggenstein): Bam HI, Eco RI, Hind III, Sal I, je 10 units / μ l

Das Schneiden der DNA erfolgte nach Enzym-Herstelleranweisung für 1-4 Stunden bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Stop-Puffer (1/10 des Volumens) und Erhitzen auf 65 °C für 5-10 Min. beendet. Um ein Aneinanderlagern der Einzelstrang-Enden ("reannealing") zu vermeiden, wurde die Probe sofort auf Eis gestellt. Die Auftrennung erfolgte über Nacht bei 24 Volt/cm im Agarosegel. Die Auswertung des Gels erfolgte über ein Polaroid-Photo (Blende 5,6; 20-30 Sekunden für Negativfilme). Zur späteren Zuordnung der Banden wurde ein Zentimetermaß an das Gel angelegt.

3.1.3.2. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Material:

Acryl-Bisacrylamid (AA) 30:0,8 w/v in H₂O (Fa. Biorad, München)

Tris-HCl 3 M, pH 8,8 als Trenngelpuffer Stammlösung

Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 als Sammelgelpuffer Stammlösung

Natriumdodecylsulfat (SDS) 20% in H_2O
Ammoniumperoxodisulfat (AMPER) 1,5% H_2O (Fa. Merck, Darmstadt)
TEMED (Fa. Biorad, München)

4-fach Loading buffer:

10 % SDS (w/v)
10 % β -Mercaptoethanol (v/v) (Fa. Biorad, München)
50 % Sucrose (w/v)
0.005 % Bromphenolblau (Fa. Biorad, München)

Zwei Glasplatten zum Gießen des Gels, dazwischen eingefettete Abstandshalter, mit Kartonklebeband an den Rändern und am Boden verschlossen.

Elektrophoresepuffer:

0,025 M Tris
0,192 M Glycin
0,1 % SDS

Färbelösungen zur Silberfärbung nach Merill et al. (1981):

Methanol, reinst

Eisessig, reinst, mind. 96%

Kaliumdichromat 10 g/l H_2O (34 mM)

Salpetersäure, reinst

Silbernitrat 0,02% in H_2O

Natriumcarbonat 29,6 g/l H_2O (0,28 M)

Formalin, reinst

(Alle Substanzen für die Färbung von Fa. Merck, Darmstadt)

Die Auftrennung der geschnittenen (wie in Abschnitt 3.3.1. beschrieben) Virus-DNA erfolgte bei 50 V für 16 Stunden in einer Elektrophoreseapparatur nach Studier (1973). Nach der Silberfärbung (Merill et al., 1981) wurde das Gel fotografiert, auf Filterpapier überführt und getrocknet.

3.1.3.3. Southern-Blot

Diese Methode wurde von Southern (1975) eingeführt. Die Methode wurde hier insofern modifiziert, als für ein Gel zwei Nitrozellulosefilter verwendet wurden ("Doppel-Sandwich-Blot").

Material:

2 Glasplatten

Zellstoff

Parafilm

3 MM Chr Chromatographiepapier (Fa. Whatman, Maidstone; England)

Zellulosenitratfolie BA 45, 0,45 μm (Fa. Schleicher und Schuell, Dassel)

0,5 N NaOH/0,9 M NaCl

1 M Tris-HCl/0,9 M NaCl (pH 7,4)

12 x SSC (1 x SSC: 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-Citrat)

6 x SSC

4 x SSC

Nach dem Fotografieren wurde das Gel 1 Stunde in H_2O entfärbt, die DNA dann 2 x 15 Min. in NaOH / NaCl denaturiert, kurz mit H_2O gespült, 2 x 30 Min. Tris-HCl / NaCl neutralisiert und danach 10-30 Min. in 6 x SSC unter leichtem Schütteln äquilibriert. Die Nitrozellulosefilter wurden auf Gelgröße zugeschnitten, auf H_2O gelegt, bis sie gleichmäßig durchnässt waren und anschließend in 4 x SSC eingeweicht. Die in der gleichen Größe zugeschnittenen Whatman-Filter wurden in 12 x SSC eingeweicht.

Der Blot-Aufbau erfolgte von unten nach oben folgendermaßen:

- 1 Glasplatte,
- mehrere Lagen Zellstoff, ca. 2 cm dick und ca. 1 cm über das Gel überstehend,
- 3 Whatman-Filter in Gelgröße,
- 1 Nitrozellulosefilter,
- das Gel,
- 1 Nitrozellulosefilter,
- 3 Whatman-Filter in Gelgröße,
- mehrere Lagen Zellstoff,
- 1 Glasplatte

Zwischen Gel und Nitrozellulosefilter wurden am Rand schmale Parafilmstreifen gelegt, um einen Kurzschluß des Pufferflusses um das Gel herum zu vermeiden. Zwischen Gel und Nitrozellulosefilter liegende Luftblasen unterbrechen den DNA-Transfer. Nach Auftropfen von 5 ml 4 x SSC

wurden die Luftblasen mit einer Glaspipette vorsichtig ausgerollt. Diese Anordnung wurde mit einem Gewicht von ca. 500 g beschwert, nach 2-4 Stunden die Nitrozellulosefilter entnommen und zwischen zwei Whatman-Filtern für 2 Stunden bei 80 °C im Vakuumtrockenschrank gebakken. Die Blots konnten dann für längere Zeit dunkel und trocken aufbewahrt werden.

3.1.3.4. Isolierung einzelner DNA-Fragmente

Material: entsprechend Abschnitt 3.2.2.

Um einzelne DNA-Fragmente für die Nick Translation und Hybridisierung zu gewinnen, wurden die aus dem Agarosegel herausgeschnittenen Fragmente zur Freisetzung der DNA zweimal jeweils eine halbe Stunde bei -70 °C / Raumtemperatur gefriergetaut. Nach Reinigung der dabei gelösten DNA von Agaroseresten durch ein mit silikonisierter Glaswolle verstopftes Eppendorfgefäß für 1 Min bei 10000 rpm wurde je 1 mal mit dem gleichen Volumen Phenol, Phenol/IAC und IAC extrahiert, mit Ethanol gefällt, wie in Abschnitt 3.1.2.1.2. beschrieben und die vakuumgetrockneten DNA-Pellets in 5-10 µl TE aufgenommen.

3.1.3.5. Nick Translation

Material:

Nick Translation Reagenz Kit (Fa. BRL, Eggenstein)

5% SDS (w/v) in H₂O

Sephadex Minisäule: Sephadex G50 medium oder coarse (Fa. Pharmacia, Freiburg) in 50 mM Tris-HCL (pH 7,5) mit 0,1% SDS wurde in eine mit silikonisierter Glaswolle verschlossene 1 ml Einmalspritze eingefüllt und exakt 4 Min. bei 1800 rpm zentrifugiert.

Der Ansatz erfolgte auf Eis:

4 µg DNA-Probe

5 µl Solution A (dATP, dCTP, dGTP)

2,5 µl Bio-11-UTP

ad 45 µl mit aqua bidest.

5 µl Solution C (DNase-Polymerase Mix)

Inkubation bei 15 °C für 90 Min.

5 µl Solution D (Stop-Puffer, 300 mM EDTA)

1,25 µl 5% SDS

Reinigung über die Sephadex Minisäule: Der Ansatz wurde auf die Säule aufgetragen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die in einem Eppendorfgefäß aufgefangene markierte DNA konnte mehrere Monate bei 4 °C aufbewahrt werden.

3.1.3.6. Hybridisierung

Material:

20 x SSC

20% SDS (w/v) in H₂O

Deionisiertes Formamid:

50 ml Formamid (Fa. Fluka, Schweiz)

5 g AG 501-X 8 (Fa. Bio Rad, München)

30 Min. bei Raumtemperatur rühren

2 mal durch Filterpapier abfiltrieren

10 ml Aliquots bei -20 °C aufbewahren

Denhardt's Lösung:

5 g Ficoll

5 g PVP (Polyvinylpyrrolidon)

5 g BSA

ad 500 ml aqua dest., steril filtrieren

25 ml Aliquots bei -20 °C aufbewahren

0,5 M Pipes: 15,17 g in 100 ml aqua dest., steril filtrieren

Heringssperma-DNA (Mack, Illertissen): 10 mg/ml aqua dest., gut geschert (durch mehrmaliges Aufziehen in eine 10 ml Spritze und Auspressen durch eine Kanüle), 10 Min. gekocht, in 1 ml Aliquots bei -20 °C aufbewahrt, vor Gebrauch 10 Min. aufgekocht.

Hybridisierungslösung:

5 ml 20 x SSC

2 ml 50 x Denhardt's Lösung

2 ml 0,5 M PIPES

10 ml Formamid,

steril filtriert, auf 45 °C Hybridisierungstemperatur gebracht, mit 1 ml aufgekochter Heringssperma-DNA versetzt.

DNA Detection System (Fa. BRL, Heidelberg)

Puffer 1:	0,1 M	Tris-HCl pH 7,5
	0,1 M	NaCl
	2 mM	MgCl ₂
	0,05 %	(w/v) Triton X-100
Puffer 2:	3 %	BSA (w/v) in Puffer 1
Puffer 3:	0,1 M	Tris-HCl pH 9,5
	0,1 M	NaCl
	50 mM	MgCl ₂

Jeder Puffer steril filtriert

20 mM Tris (pH 7,5) / 5 mM EDTA

Nach Floaten und Einweichen der Nitrozellulosefilter (aus 3.3.1.) in 5 x SSC und Überführen in einen Plastikbeutel wurde zur Prähybridisierung pro cm² 0,1 ml der Hybridisierungslösung zugegeben. Die Prähybridisierung im 45 °C Wasserbad war nach 4 Stunden abgeschlossen. Nach Entfernen der Prähybridisierungslösung wurde nochmals pro cm² 0,1 ml der Hybridisierungslösung zugegeben. Dieser wurde zuvor die 10 Min. aufgekochte biotinmarkierte DNA-Probe (aus 3.1.3.5.) beigemischt. Die Inkubation der Filter erfolgte über Nacht. Die Filter wurden anschließend 2 mal 3 Min. in 5 x SSC + 0,1% SDS, 2 mal 3 Min. in 2 x SSC + 0,1% SDS und bei 50 °C 2 mal 15 Min. in 0,3 x SSC + 0,1% SDS gewaschen. Die Hybridisierungsflüssigkeit konnte mehrmals verwendet werden. Dazu wurde sie vor Gebrauch für 15 Min. auf 60 °C erhitzt und auf 45 °C abgekühlt.

Die kurz in Puffer 1 gespülten und für 20 Min. bei 42 °C in Puffer 2 inkubierten Filter wurden 30 Min. bei 80 °C im Vakuumtrockenschrank gebakken und in Puffer 2 rehydriert.

Die Färbung erfolgte mit den im DNA Detection Kit enthaltenen Reagenzien:

- Streptavidinlösung (1 µl / ml Puffer 1):
Das Filter wurde mit 3 ml/100 cm² für 10 Min. bei leichtem Bewegen inkubiert, dann exakt 3 mal 3 Min. mit Puffer 1 gewaschen.
- Biotin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat (0,5 µl / ml Puffer 1):
Es wurde mit der selben Menge wie im vorigen Absatz 10 Min. bei leichtem Bewegen inkubiert, dann 2 mal 3 Min. in Puffer 1 und 2 mal 3 Min. in Puffer 3 gewaschen.

- Färbelösung (33 μ l NBT + 25 μ l BCIP in 7,5 ml Puffer 3):
Die Filter wurden bis zur vollständigen Entwicklung in der Färbelösung im Dunklen aufbewahrt. Nach Beenden der Reaktion und sorgfältigem Abspülen der Färbelösung mit Tris/EDTA konnten die Filter in Tris/EDTA aufbewahrt werden.

3.1.4. Klonierung von DNA-Fragmenten

3.1.4.1. Klonierung im Bakteriophagen Lambda

3.1.4.1.1. Klonierung

Material:

Vektor: Bakteriophage Lambda Stamm EMBL 3 bzw 4, DNA vorverdaut mit den Enzymen Bam HI bzw Eco RI als EMBL-arms (Frischauf et al., 1983) (Fa. Promega, Heidelberg)

Bakterienstämme: LE 392, P2 392 (Lit. bei Maniatis et al., 1982) (Fa. Promega, Heidelberg)

Lambda-Phagen in vitro package system (Packagene, Fa. Promega, Heidelberg)

Ligationsansatz: DNA maximal 3 μ l

- 1 μ l 10 x Tris-Acetat-Puffer pH 7,4
- 1 μ l 0,1 M $MgCl_2$
- 1 μ l 0,1 M Cleland's Reagenz (DTT, Fa. Serva, Heidelberg)
- 1 μ l BSA (50 mg/ml H_2O , DNasefrei, Fa. Pharmacia, Freiburg)
- 1 μ l 10 mM ATP (Fa. Boehringer, Mannheim)
- 1 μ l T4-DNA-Ligase (Fa. Genofit, Heidelberg)
- ad 10 μ l H_2O

1 μ g EMBL-arms-DNA (jeweils ein Ansatz mit EMBL 3 bzw EMBL 4 DNA) wurde mit 0,6 μ g EHV 1 DNA (entspricht einem 10-fachen Überschuß an Insert-Enden pro Vektor-Enden) in 10 μ l Ligationsansatz über Nacht bei 4 °C ligiert und am nächsten Tag nach Anweisung des Herstellers (Packagene Fa. Promega, Heidelberg) in vitro in Phagenköpfe verpackt. Die Hälfte der Phagen wurde auf dem Stamm LE 392, die andere Hälfte auf dem P2-lysogenen Stamm P2 392 in den Verdünnungen 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} ausplattiert wie im folgenden Abschnitt beschrieben. Nach 8 Stunden konnten die Plaques gezählt und von der P2 392-Platte einzelne Plaques

gepickt werden. Zur DNA-Gewinnung wurden diese Plaques auf LE 392 weiter vermehrt.

3.1.4.1.2. DNA-Isolierung

Material:

NZCY-Medium: 10 g Typ A-Casein-Hydrolysat,
5 g Bacto-Hefe-Extrakt,
1 g Casamino-säuren (Bacto-Trypton),
5 g NaCl,
2 g $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
ad 1 l aqua dest., pH 7,5 autoklaviert

NZCYM Top-Agarose: NZCYM + 0,7% Agarose, autoklaviert
0,2% Maltoselösung
0,01 M MgSO_4

Phagen-Puffer (SM):

5,8 g NaCl,
2 g MgSO_4 ,
50 ml Tris-HCl, pH 7,5,
5 ml 2% Gelatine,
ad 1 l aqua dest., autoklaviert

RNase 10 mg/ml Tris-HCl (pH 7,5) und 15 mM NaCl, 15 Min. auf 100 °C
zur Inaktivierung von DNase erhitzen, Aliquots bei -20 °C aufbewahrt
DNase 10 mg/ml
20% PEG 6000 (Fa. Merck) (w/v) in 2 M NaCl/SM
10 % SDS in H_2O
0,5 M EDTA pH 8,0
TE (10/1), pH 8,0

Zur Phagenvermehrung wurden ca. 6×10^6 Phagenpartikel (entspricht ca. der Phagenernte aus 1 Plaque) ausplattiert. Dazu wurden die Bakterien einer in NZCYM mit 0,2% Maltose frisch angelegten Über-Nacht-Kultur pelletiert und im 0,4-fachen Volumen 0,01 M MgSO_4 resuspendiert. 0,1 ml Bakterien wurden mit der auszuplattierenden Phagensuspension gemischt und zur Adsorption 20 Min. bei 37 °C inkubiert. 3 ml einer auf 47 °C vorgewärmten Top-Agarose wurden mit der Bakterien/Phagensuspension vermischt und durch vorsichtiges Kippen ohne Luftblasen auf einer NZCYM-Platte verteilt. Nach ca. 8-12 Stunden waren konfluierende Plaques zu erkennen. Die Phagen wurden dann durch Übersichten der Platte mit 5 ml Phagen-Puffer 1-2 Stunden bei leichtem Schütteln eluiert.

Durch Zentrifugieren (10 Min, 8000g, 4 °C) wurden Zelltrümmer und Agarosereste entfernt. Der die Phagen enthaltende Überstand wurde mit 1 µg/ml RNase und DNase 30 Min. bei 37 °C inkubiert, die Phagen durch Zugabe des gleichen Volumens PEG 1 Stunde auf Eis präzipitiert und anschließend 20 Min. mit 10000 g bei 4 °C das Phagen-Pellet abgetrennt. Das erhaltene Pellet wurde in 0,5 ml TE-Puffer aufgenommen, in einem Eppendorfgefäß von unlöslichen Bestandteilen gereinigt (2 Min., 8000 g, 4 °C) und mit 5 µl 10% SDS und 5 µl 0,5 M EDTA 15 Min. bei 68 °C inkubiert. Nach Extraktion der Proteine mit je 500 µl Phenol, Phenol/IAC (1:1), IAC und Fällung der DNA mit Iso-Propanol (50 µl, 20 Min. bei -70 °C) und zweimaligem Waschen mit 70% Ethanol wurde die DNA in 50 µl TE-Puffer resuspendiert und nach Schneiden mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease über die Gelelektrophorese analysiert.

3.1.4.1.3. Plaque-Selektion (Phage-Lifting)

Material:

Runde Nitrozellulosefilter BA 85/22 (Fa. Schleicher und Schuell, Dassel)
0,1 N NaOH/1,5 M NaCl
0,2 M Tris HCl (pH 7,5)

Die Vermehrung erfolgte wie im vorigen Abschnitt beschrieben, jedoch wurden, um einzelne Plaques (max. 1500/Platte) besser abgrenzen zu können, unterschiedliche Verdünnungen der auszuplattierenden Phagensuspension verwendet. Vor dem "phage lifting" mußten die Platten mindestens 1 Stunde bei 4 °C gekühlt sein, um den Agar-Overlay zu verfestigen und ein Hängenbleiben des Agars an den Filtern zu vermeiden. Die Zellulosenitrat-Rundfilter wurden auf den Agar aufgelegt und, ohne sie zu verschieben, wieder abgenommen (der erste Filter wurde nach 1 Min. entfernt, jeder weitere Filter blieb 1 Min. länger auf dem Agar, der Vorgang wurde bis zu vier mal wiederholt). Nach Denaturieren mit 0,1 N NaOH/1,5 M NaCl für 1 Min., Neutralisieren in 0,2 M Tris-HCl (pH 7,5) für 1 Min. und Inkubation in 2 x SSC für 5 Min. wurden die Filter 1-2 Stunden bei 80 °C im Vakuumtrockenschrank gebacken. Um Bakterienzellreste zu entfernen, wurde 30-60 Min. bei 37 °C in 2 x SSC mit 0,5 mg Proteinase K/ml und 0,1% SDS (ca. 10 ml/Filter) inkubiert. Nach Waschen der Filter (2 mal 5 Min.) in 2 x SSC wurden, wie in Abschnitt 3.1.3.6. beschrieben, die Prähybridisierung und Hybridisierung durchgeführt. Die durch die Hybridisierung identifizierten Plaques konnten mit einer silikonisierten Pasteurpipette ausgestochen werden.

3.1.4.2. Klonierung in pBR 322

3.1.4.2.1. Ligierung

Material:

Vektor: pBR 322 (Fa. Promega, Heidelberg)

10 x TA-Puffer:	0,33 M	Tris-Acetat (pH 7,9)
	0,66 M	Kaliumacetat
	0,10 M	Magnesiumacetat
	5 mM	Dithiotreitol
	1 mg/ml	Rinderserumalbumin (BSA), (Fa. Serva, Heidelberg) nukleasenfrei
		Aliquots bei -20 °C aufbewahren

Bakterielle alkalische Phosphatase (BAP, Fa. BRL, Eggenstein)

Ligase: T4 DNA Ligase (Fa. Boehringer, Mannheim)

STEN:	0,6 M	NaCl
	0,1 M	Tris-HCL (pH 7,4)
	2 mM	EDTA
	1 %	(w/v) SDS, autoklaviert

ATP: 10 mM in aqua bidest., pH 7,0 mit 0,1 N NaOH, autoklaviert

BSA: nukleasefrei (Fa. BRL, Eggenstein), 0,5 mg/ml H₂O, steril filtriert

DTT: 100 mM in 10 mM Natriumacetat (pH 5,0), steril filtriert

ATP, BSA und DTT werden bei -20 °C gelagert

Die Restriktionsenzymspaltung von Virus- und Vektor-DNA wurde mit Bam HI im entsprechenden Reaktionspuffer durchgeführt. Es wurden DNA-Mengen im Molverhältnis 1:1 eingesetzt. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei 37 °C wurde durch Gelelektrophorese auf komplette Spaltung der DNA geprüft. Zur Verhinderung einer Selbst-Ligierung wurde die Vektor-DNA mit BAP für 1 Stunde bei 65 °C inkubiert (50 units BAP sind nötig, um 1 µg pBR 322 DNA zu dephosphorylieren). Zur Inaktivierung der BAP wurden der BAP-Ansatz und der Virus-DNA-Ansatz mit Phenol und STEN gemischt, 2 Min. bei 8000 rpm zentrifugiert und die obere Phase entnommen. Der Vorgang wurde noch 2 mal mit IAC wiederholt. Die gereinigte DNA wurde, wie in Abschnitt 3.1.2.1.2. beschrieben, mit Ethanol gefällt, zur Ligierung in 1 x TA-Puffer gelöst. Der Ligaseansatz wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur und darauf bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Kontrolle der Ligase-Reaktion erfolgte durch Gelelektrophorese.

30

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton
 5 g Bacto-Hefe-Extrakt
 5 g NaCl
 ad 1 l aqua dest., pH 7,5

LB-Platten: 1 l LB, 12 g Agarose

Ampicillin (50 µg/ml Endkonzentration),

Tetracyclin (10 µg/ml Endkonzentration)

LB/Amp- und LB/Tet-Platten: wie LB-Platten, nach Abkühlen auf 65-60 °C wurden Ampicillin und Tetracyclin zugemischt

Von einer frisch auf LB-Platten ausgestrichenen Bakterien-Einzelkolonie wurde für die Transformation nach Hanahan (1980) in 2 ml SOB eine Über-Nacht-Kultur angelegt. Diese wurde in 50 ml SOB-Medium 1:50 verdünnt und bei 37 °C inkubiert. Bei Erreichen einer Optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,4-0,5 nach 1,5 bis 3 Stunden kamen die Bakterien sofort für 15 Min. auf Eis, bevor sie 5 Min. bei 4 °C und 4000 rpm abzentrifugiert wurden. Die sedimentierten, in 1/3 des Ausgangsvolumens Transformation buffer (TFB) resuspendierten Bakterien wurden erneut auf Eis gestellt, nochmals zentrifugiert und in 1/25 des Ausgangsvolumens TFB resuspendiert. Nach Zugabe von 3,5% DMSO und 5 Min. auf Eis, Zugabe von 75 mM DTT-KOAc und weiteren 10 Min. auf Eis, nochmaliger Zugabe von 3,5% DMSO und 5 Min. auf Eis, waren die Bakterien zur DNA-Aufnahme bereit (kompetent). Zu 200 µl der Bakterien wurde die DNA gegeben und 30 Min. auf Eis gestellt. Zur Aufnahme der DNA mußte der Ansatz exakt 2 Min. auf 42 °C erwärmt, sofort 2 Min. auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 800 µl SOC zur Expression der auf dem Plasmid kodierten Ampicillinresistenz 1 Stunde bei 37 °C inkubiert werden. Die in 100 µl SOB eingeeengten Bakterien (1 Min., 8000 rpm) wurden auf LB/AMP-Platten ausplattiert. Bakterienkolonien konnten am nächsten Tag mit sterilen Zahnstochern einzeln auf eine LB/AMP- und eine LB/TET-Platte übertragen werden. Von Einzelkolonien der Bakterien mit Ampicillin-Resistenz, jedoch ohne Tetracyclin-Resistenz, wurden Über-Nacht-Kulturen für den Plasmid-DNA-Schnelltest angelegt.

3.1.4.2.3. DNA-Isolierung

Material:

Chloramphenicol 75 mg / 1 ml 100% Ethanol, bei -20 °C aufbewahren, davon 2 ml/1 ml LB

Glucose-EDTA-Lösung:

50 mM Glucose
10 mM EDTA
25 mM Tris (pH 8,0)
steril filtriert

Lysozym (Fa. Boehringer, Mannheim)

NaOH (0,2 N) / SDS (1%)

3 M Natriumacetat auf pH 4.8 mit Eisessig eingestellt

CsCl (Fa. Boehringer, Mannheim)

Plasmid-DNA-Schnelltest:

400 µl der Über-Nacht-Kulturen wurden in einem Eppendorfgefäß pelletiert, in 100 µl Glucose-EDTA-Lysozym-Lösung (2 mg Lysozym/ml Glucose-EDTA) resuspendiert und 30 Min. auf Eis gestellt. Die Lysis erfolgte mit 100 µl NaOH-SDS-Lösung und vorsichtigem Mischen. Nach 5 Min. auf Eis wurde 150 µl Natriumacetat zugegeben, 60 Min. auf Eis die chromosomale DNA mit den Bakterienzellwänden ausgefällt und durch 10-minütiges Zentrifugieren abgetrennt. Die Plasmid-DNA im Überstand ließ sich nach Zugabe von 1 ml absolutem, eiskaltem Alkohol 30 Min. bei -70 °C konzentrieren. Das in 5 µl Tris-acetat-Puffer 5 Min. bei 37 °C resuspendierte DNA-Pellet wurde nochmals in 300 µl Alkohol gefällt, wieder pelletiert und vakuumgetrocknet. Um RNA-Verunreinigungen zu entfernen, wurde das DNA-Pellet 30-40 Min. bei 37 °C in 20 µl Restriktionsenzympuffer mit Ribonuklease (25 µg/ml aus 10 mg/ml Stammlösung 1/400 verdünnt) behandelt. Anschließend konnte die DNA mit einer Restriktionsendonuklease (1 unit Enzym/Probe) 2 Stunden bei 37 °C geschnitten und über Gelelektrophorese beurteilt werden.

Plasmid-DNA-Reinigung aus 1 l Bakterienkultur (Großansatz):

5 ml einer Über-Nacht-Kultur in 50 ml LB/AMP-Medium wurden 1:50 verdünnt und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 in 1 l LB/AMP 1:20 verdünnt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 wurde für eine erhöhte Plasmidausbeute Chloramphenicol (0,2 ml/100 ml) zugegeben und über Nacht weiter inkubiert. Die pelletierten Bakterien wurden in 2 ml Glucose-EDTA-Lysozym-Lösung (5 mg Lysozym/ml Glucose-EDTA) resuspendiert und 5 Min. bei

Raumtemperatur belassen. Nach Lysis der Bakterien mit 4 ml NaOH-SDS-Lösung für 10 Min. bei RT, wurden die chromosomale DNA und Zellwandreste mit 0,4 ml Natriumacetat 10 Min. bei 4 °C gefällt. Nach Zentrifugieren bei 12000 rpm im SS 34-Rotor (Fa. Sorvall) wurde der plasmidhaltige Überstand, das "cleared lysate", mit Ethanol gefällt, das DNA-Pellet in 8 ml TE-Puffer aufgenommen, 8 g CsCl zugegeben und über eine CsCl Gradienten Zentrifugation gereinigt. Die weitere Verfahrensweise ist in Abschnitt 3.1.2.1.2. beschrieben.

3.1.5. Überprüfung der Virulenz verschiedener Passagen des Stammes Rac H in Hamstern

3.1.5.1. Virustitration

Material:

Falcon 96 Loch Mikro-Zellkulturplatten (Fa. Becton Dickinson, Oxnard; Schweiz)

Das Virusmaterial wurde in Glasröhrchen 10^{-2} bis 10^{-6} vorverdünnt und 100 µl davon auf frisch ausgesäte equine embryonale Lungenzellen pipettiert. Nach 4-5 Tagen konnte der cpE abgelesen und nach Spearman und Kaerber (Lit. in Mayr et al., 1974) die Gewebekulturinfektiöse Dosis (GKID₅₀) bestimmt werden.

3.1.5.2. Versuchsdurchführung

Versuchstiere: syrische Hamster

Aus Gründen des Tierschutzes wurde auf eine Titration des Virus in Hamstern verzichtet. Die bereits in der Literatur (Mayr et al., 1968) vorhandenen Daten konnten zur Planung des Versuches herangezogen werden. Pro Virusstamm wurde ein Wurf am 5. Tag p.p. mit je 50 µl Virussuspension intraperitoneal infiziert. Die Dosis wurde nach den Literaturdaten mit PBS auf das 10^4 -fache der GKID₅₀ eingestellt, um mit Sicherheit einen pathogenen Effekt bei Virulenz zu erhalten und unspezifische Effekte durch toxische Substanzen aus der Zellkultur auszuschließen.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Veränderungen im Genoms des EHV 1-Stammes Rac H im Verlauf der Viruspassagierung

3.2.1.1. Charakterisierung der DNA von Virusisolaten des EHV 1-Stammes Rac H nach verschiedenen Passagen mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Die Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Restriktionsenzymmuster der DNA verschiedener Passagen des EHV 1-Stammes Rac H, die für die Untersuchungen zur Verfügung stand. Die über Cäsiumchloridgradienten gereinigte Virus-DNA wurde nach Schneiden mit der Restriktionsendonuklease Bam HI über ein 0,7% Agarosegel aufgetrennt. Aus der Abbildung 1 wird ersichtlich, daß sich die Virus-DNA des Stammes Rac H während der Attenuierung verändert hat. Die im unteren Bereich des Agarosegels laufenden, kleineren Fragmente der Virus-DNA zeigen nach der 185. Passage (Bahn 2), und noch ausgeprägter nach der 256. Passage (Bahn 4) Veränderungen ihrer Laufstrecken gegenüber der Virus-DNA der 12. Passage (Bahn 1). Im oberen Bereich des Agarosegels (Fragmente größer als 5,9 Kbp) sind kaum Unterschiede in den Laufstrecken zu erkennen.

Die Intensität der Banden gibt Aufschluß über die Molarität der DNA-Fragmente. Durch die geringere Einlagerung von Ethidiumbromid in kürzere DNA-Fragmente gleicher Molarität nimmt deren Helligkeit im Agarosegel von oben nach unten ab. Banden, die im Gel stärker oder schwächer als äquimolare Banden erscheinen, werden als mehrfach- bzw submolar interpretiert. Die 4. Bande der Bahnen 2,3 und 4, die 5. Bande aller 4 Bahnen sowie die 12. und 13. Bande in der Bahn 1 lassen sich als mehrfach molar erkennen. In Bahn 2 fällt eine submolare Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 5,5 Kbp auf. Die Bahnen 1 und 2 zeigen im Bereich von 4,1 Kbp bis 4,5 Kbp submolare Banden heterogener Größe.

Die geschnittene DNA von Virusmaterial der 185. Passage zeigte nach Vermehrung auf heterologen Zellkulturen, in diesem Fall der Kaninchen-nierenzelllinie (RK₁₃, Bahn 3) ein anderes Muster als nach Vermehrung über homologe Zellen (EEL, Bahn 2). Die Viruspopulation stellt sich dabei als inhomogen dar. Die weiteren Versuche wurden mit plaquegereinigtem Virusmaterial durchgeführt.

Abbildung 3 zeigt eine Übersicht über die verwendeten plaquegereinigten Subpopulationen. Dargestellt ist die Virus-DNA (Schnellextraktion) nach

Schneiden mit der Restriktionsendonuklease Bam HI und Agarosegelelektrophorese. Die DNA in Bahn 3 repräsentiert den am häufigsten isolierten Typ. Die beiden anderen Typen konnten nur jeweils einmal isoliert werden. In Bahn 4 ist schnellextrahierte DNA vom EHV 1-Stamm Rac H nach der 12. Passage dargestellt. Die bei allen Präparaten unterhalb Bande A und B auftretenden submolaren Banden sind typisch für die Extraktion zellgebundener Virus-DNA und resultieren aus einer Bildung von Konkatermen während der Replikation. Dafür sind die das rechte und linke Ende des Genoms darstellenden Fragmente nicht zu erkennen. In Abbildung 2 ist über Cäsiumchloridgradienten gereinigte DNA der entsprechenden plaquegereinigten Isolate abgebildet. Submolare Fragmente treten hier nicht auf. Es sind, wie zu erwarten, Banden erkennbar, die dem rechten (4,0 Kbp) und dem linken (9,5 Kbp) Genomende entsprechen.

Abbildung 1: Verschiedene Rac H-Passagen (ENS) nach Spaltung der DNA mit Bam HI und Auftrennung im 0,7% Agarosegel.

(1) Rac H 12. P., (2) Rac H 185. P., auf EEL vermehrt, (3) Rac H 185. P., 1 mal auf RK₁₃ vermehrt, (4) Rac H 256. P., (5) Referenzstamm Kentucky D, (6) KB-Ladder

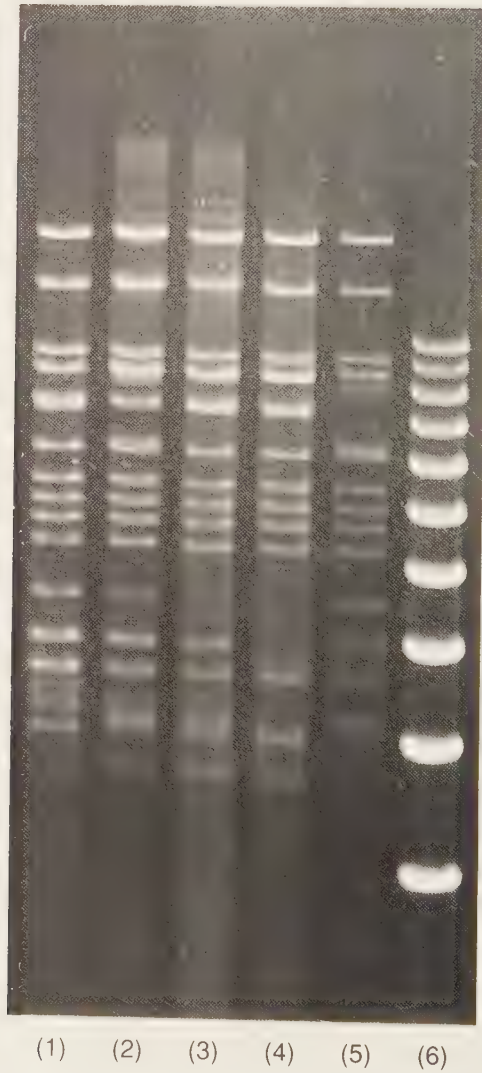
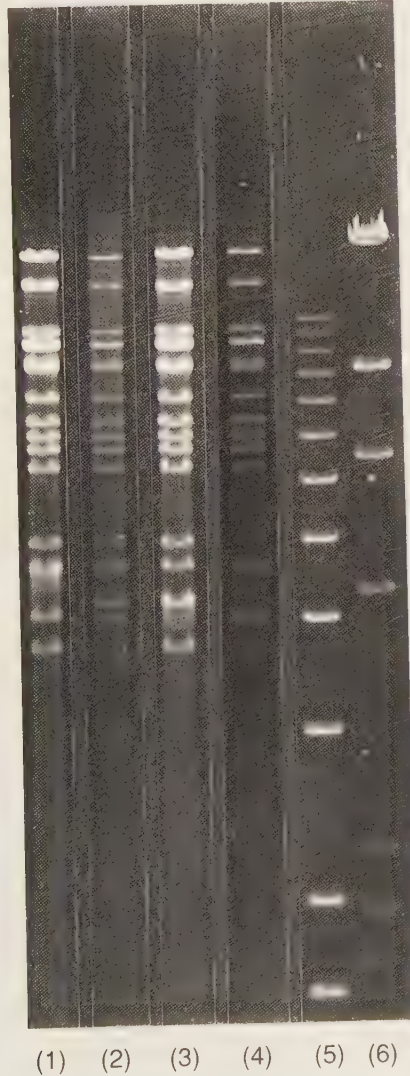


Abbildung 2: Über Cäsiumchloridgradienten gereinigte DNA von 3 Isolaten nach Plaquereinigung von Virusmaterial der 185. P., geschnitten mit Bam HI und aufgetrennt im 0,7% Agarosegel.

(1) Plaqueisolat 1 (P1), (2) Plaqueisolat 2 (P2), (3) Plaqueisolat 3 (P3), (4) Rac H 256. P., (5) KB-Ladder, (6) Lambda-DNA mit Hind III geschnitten



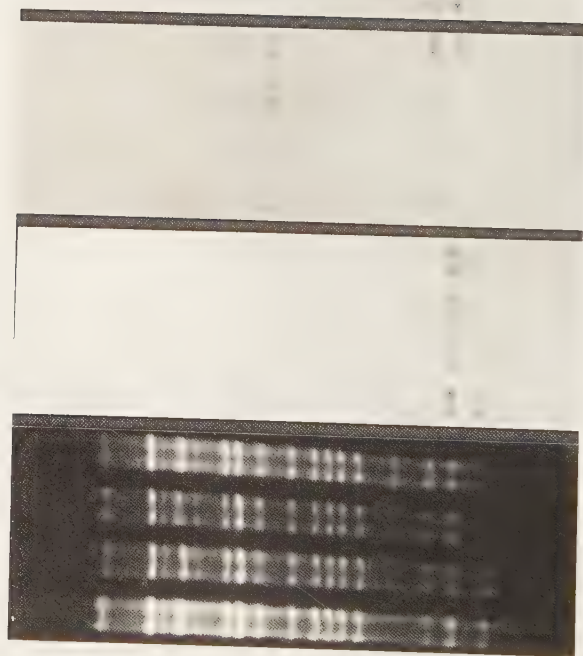


Abbildung 3

Abbildung 4

Abbildung 3: Schnellextrahierte DNA von 3 Isolaten der 185. P. nach Plaquereinigung, geschnitten mit Bam HI und aufgetrennt im 0,7% Agarosegel.

(1) Plaqueisolat 2 (P2), (2) Plaqueisolat 3 (P3), (3) Plaqueisolat 1 (P1), (4) Rac H 12. P.

Abbildung 4: Hybridisierung von Rac H (256. P.) -Bam-HI-Fragmenten gegen 3 Plaqueisolate von Rac H 185. P. (P1, P2, P3 x Bam HI) aus Abbildung 3.

Rac H M/N/O-Fragment (A), P/Q-Fragment (B), R-Fragment (C) hybridisiert gegen P2 (1), P3 (2), P1 (3), Rac H 12. P. (4)

3.2.1.2. Überprüfung der Virulenz verschiedener Passagen des EHV 1-Stammes Rac H in syrischen Hamstern

Sechs von sieben intraperitoneal mit Virusmaterial der 12. Passage des Stammes Rac H infizierte Hamster verendeten nach virusspezifischer Erkrankung am 3. Tag p.i. Alle 6 Tiere eines mit Virusmaterial der 256. Passage des Stammes Rac H infizierten Wurfes zeigten keine Krankheitsercheinungen. Der mit plaquegereinigtem Virusmaterial der 185. Passage (P1) infizierte Wurf von 9 Tieren überlebte ebenfalls. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse des Infektionsversuches.

Passagen in ENS	GKID ₅₀ /ml	Letalität	Letalität (%)
12. P.	10 ^{6,5}	6/7	86
185. P. (P1)	10 ^{6,25}	0/9	0
256. P.	10 ^{8,0}	0/6	0

Tabelle 1: Letalität des EHV 1-Stammes Rac H für syrische Goldhamster

3.2.1.3. Charakterisierung der während der Viruspassagierung auftretenden Veränderungen im Genom des EHV 1-Stammes Rac H

3.2.1.3.1. Klonierung der EHV 1 Rac H-Fragmente im Bakteriophagen Lambda

Um eine möglichst große Auswahl an DNA-Fragmenten zu erhalten, wurde zuerst das gesamte Genom der Mischpopulation von Rac H (185. Passage) in den beiden Lambda-Phagen EMBL 3 und 4 als Bam HI bzw Eco RI-Fragmente kloniert. Aus dieser "genomic library" wurden einzelne Phagen gepickt und nach Schneiden mit Bam HI im Agarosegel auf geeignete Fragmente getestet ("screening test"). Die Bam HI-Fragmente, welche etwa die gleichen Laufstrecken wie die Kentucky D Bam HI-Fragmente F, N und O aufwiesen, wurden für die Umklonierung in pBR 322 verwendet.

3.2.1.3.2. Charakterisierung der rekombinanten Plasmide

Die aus der genomic library gewonnenen rekombinanten EHV-DNA-Plasmide (pHS 01, pHS 02, pHS 03) wurden durch Hybridisierung gegen die 185. Passage von Rac H (Abbildung 8, Bahn 1) auf Homologie überprüft. Durch Vergleichen der nach Schneiden mit Bam HI gewonnenen DNA-Fragmente (Abbildung 5, Vektor-Anteil und Insert) mit dem Muster der 185. Passage von Rac H konnten diese als die entsprechenden EHV 1-Fragmente identifiziert werden. Die unteren Banden in der Abbildung 5 entsprechen der Plasmid-DNA, die oberen Banden der inserierten DNA. Von links nach rechts sind dem O-Fragment, dem F-Fragment und dem N-Fragment von Kentucky D entsprechende Banden zu erkennen. Da insbesondere das Fragment aus dem Bereich der IR-Region von weiterem Interesse ist, wurde dieses Plasmid (pHS 02) genauer charakterisiert. Durch Schneiden mit verschiedenen Restriktionsenzymen konnten die Orientierung des EHV 1-Anteils im Plasmid und die physikalische Kartierung weiterer Schnittstellen vorgenommen werden. Abbildung 6 zeigt die Fragmente nach Schneiden mit den Enzymen Sal I, Bam HI, Pst I und Eco RI. Die daraus resultierende Karte des Plasmids pHS 02 ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Größe der Plasmid-DNA beträgt 4,5 Kbp, die des Inserts 4,7 Kbp, insgesamt ca. 9,2 Kbp.

Abbildung 5: Rekombinante Plasmide pHS 01 (B), pHS 02 (C) und pHS 03 (A), mit Bam HI geschnitten und im 0,7% Agarosegel aufgetrennt. Die unteren Banden entsprechen der Plasmid-DNA, die oberen Banden der jeweils inserierten DNA. Die Fragmentgrößen sind in Kilobasenpaaren (Kbp) angegeben

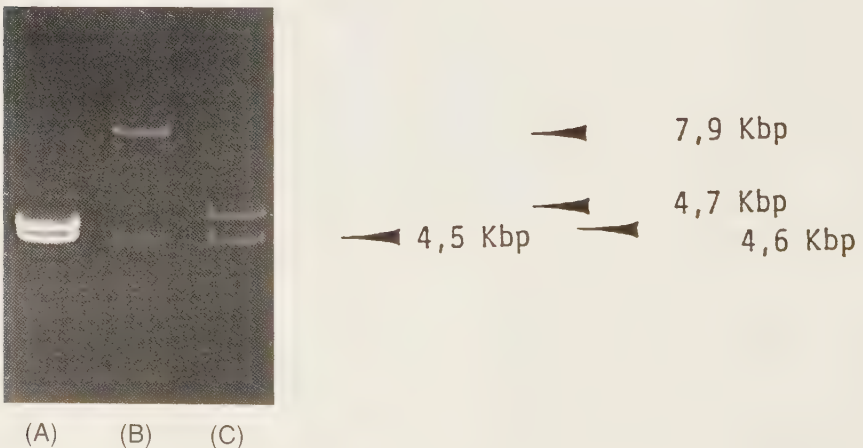


Abbildung 6: Plasmid pHS 02, mit Bam HI (1), Eco RI (2), Sal I (4), Bam HI + Sal I (5), Pst I (7), Pst I + Eco RI (8), Bam HI + Pst I (10) geschnitten und im 0,8% Agarosegel aufgetrennt. In den Bahnen 3, 6, 9 und 11 ist als Molekulargewichtsstandard KB-Ladder abgebildet

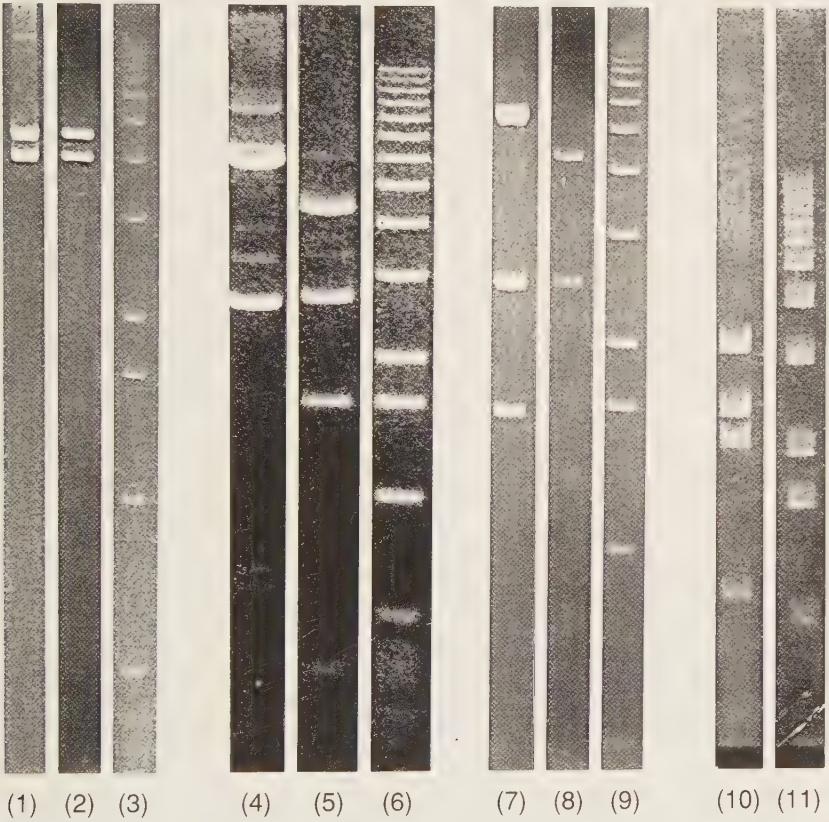
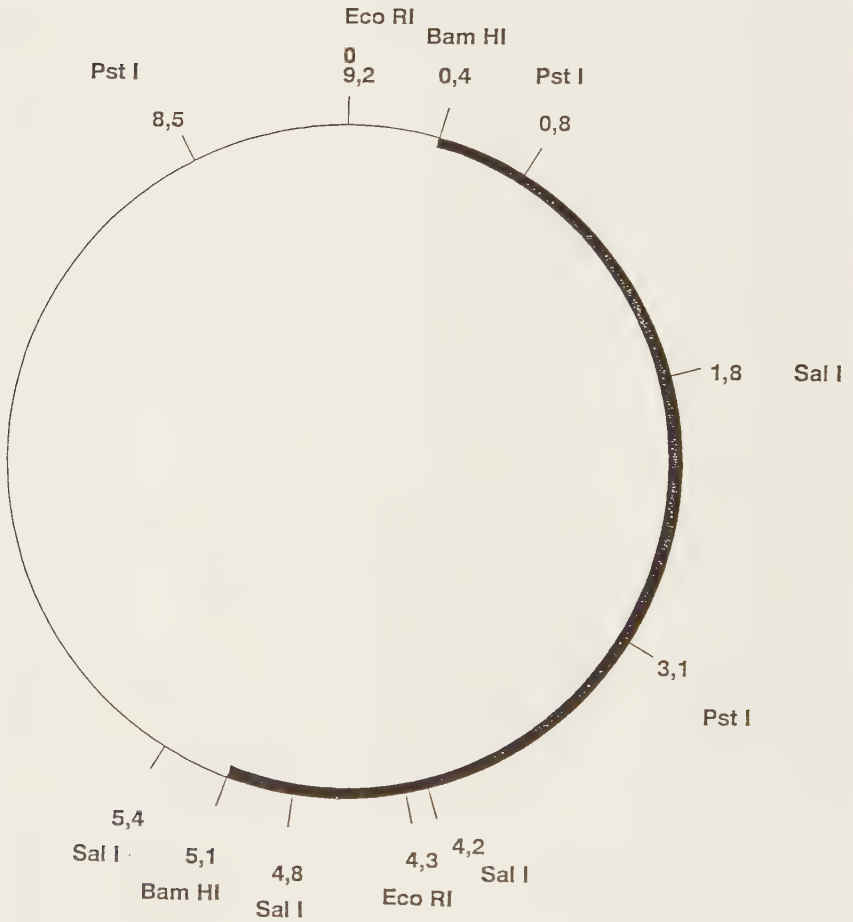


Abbildung 7: Restriktionskarte von pHS 02
 Der in pBR 322 inserierte Teil von EHV 1-DNA ist fett dargestellt.
 Die Schnittstellen sind in Kilobasenpaaren (Kbp) angegeben



3.2.1.3.3. Vergleich des Genoms von EHV 1 Rac H nach der 185. und 256. Passage

Die Untersuchungen wurden mit plaquegereinigtem Virusmaterial (P1) der 185. Passage des EHV 1-Stammes Rac H durchgeführt. Von Interesse waren vor allem die kleineren DNA-Fragmente (<6,0 Kbp), welche, wie in Abbildung 1 gezeigt, die auffälligsten Veränderungen aufwiesen. Die Abbildung 8 zeigt das Restriktionsenzymmuster von über Cäsiumchlorid-gradienten gereinigter DNA des Isolats P1 (Bahn 1-5). Zum Vergleich ist das Muster der 256. Passage (Bahn 8-12) gezeigt. Es wurde in beiden Fällen mit den Enzymen Bam HI (1), Eco RI (2), Sal I (3) und Hind III (4) geschnitten. Zusätzlich wurde die DNA einmal nacheinander mit Bam HI und Sal I (5) geschnitten, um geringfügigere Veränderungen besser beurteilen zu können. Im Agarosegel sind die Fragmente im unteren Bereich des Bildes nur schwer zu differenzieren. Deshalb wurde parallel dazu mit einem entsprechenden Ansatz ein 7,5% Polyacrylamidgel (PAG-Elektrophorese) angefertigt (Abbildung 9). Es sind hier sogar Fragmente erkennbar, die im Agarosegel überhaupt nicht zu sehen sind. Allerdings stimmen die Wanderungsstrecken einzelner DNA-Fragmente im Größenbereich von ca. 1 Kbp im Agarose- bzw Polyacrylamidgel nicht genau überein.

Deutlich ist im Agarosegel der Verlust von zwei Sal I-Banden bei etwa 3,2 und 2,5 Kbp (Bahn 3 und 10) zu erkennen. Im Größenbereich von 1,6 Kbp erscheint eine unklar auftretende Gruppe von ca. 3 Banden (Bahn 3) verstärkt zu einer einzigen verwischten kürzeren Bande (Bahn 10). Im PA-Gel sind die Banden oberhalb 2 Kbp nicht deutlich voneinander aufgetrennt, der im Agarosegel erkennbare Verlust von zwei Banden (3,2 und 2,5 Kbp) ist hier nicht eindeutig zu zeigen. Lediglich bei etwa 1,6 Kbp ist ein eindeutiger Verlust einer Bande zu erkennen. Die Veränderungen bei ca. 1 Kbp sind hier als Verlust der 5. Bande (Bahn 3) aus einer Gruppe von 3 Zweierbanden bei Rac H (185.P.) zu erkennen. Der Vergleich der Muster nach Hind III-Spaltung zeigt lediglich im oberen Teil des Agarosegels Banden unterschiedlicher Intensität bei gleicher Größe. Im PA-Gel ist bei ca. 0,8-Kbp eine klare Bande (Bahn 4) zu erkennen, der ein Bereich gleichmäßig aufeinander folgender, submolarer Banden (Bahn 10) entspricht.

Zur genauen Zuordnung wurden nun isolierte DNA-Fragmente markiert und als Sonden zum Nachweis homologer Sequenzen eingesetzt. Die DNA-Fragmente der Agarosegele aus den Abbildungen 3 und 8 (nur die Bahnen 1-4 von P1) wurden auf Nitrozellulosefilter übertragen und die biotinmarkierten Kentucky-D- und Rac H (185. und 256. Passage)-DNA-Fragmente gegen diese hybridisiert. Die Hybridisierungsreaktionen sind in den Abbildungen 12 (Teil 2,3,4) und 13 (Teil 1,2,3,4) bzw Abbildung 4

jeweils für Bam HI und Eco RI gezeigt. Die Hybridisierungsergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Kentucky D	L	MN	pHS 02	OP	pHS 03	QR	S
Rac H (185.P.)(P1) BAM HI	DE	DE M (R)	N R	M NOP R	NOP	M NOP Q	FG N
ECO RI	GHI M	B CD EF (H) M N	B CD EF K	B CD (EF) L	L	B CD L	B CD (EF)

Rac H (256.P.)	MNO		PQ			R	
Rac H (12.P.)	OPQR	(S)	EF	MN	OPQR	MN	OP
P3	NOP		FG	M	Q	M	NOP
P1	NOP	Q	FG	M	R	M	R
P2	NOP	QR	FG	M	NOP	M	R

Tabelle 2: Hybridisierungsergebnisse

Biotinmarkierte Bam HI-Fragmente von EVH 1-Kentucky D-DNA (oberer Teil) bzw EHV 1-Rac H (256.P.)-DNA (unterer Teil) wurden mit Nitrozellulose-Blots von Rac H-DNA nach Bam HI und Eco RI-Spaltung (oberer Teil) bzw Rac H-DNA und 3 Plaqueisolaten von Rac H (185.P.) nach Schneiden mit Bam HI (unterer Teil) hybridisiert. Die erste Zeile gibt jeweils die markierten Fragmente an, die Buchstaben in den darunterstehenden Spalten die Fragmente der jeweiligen Spaltung, mit denen Homologien festgestellt werden konnten. Schwach erscheinende Fragmente sind in Klammern angegeben.

Abbildung 8: Auftrennung im 0,8% Agarosegel

Über Cäsiumchloridgradienten gereinigte DNA des Isolats P1 von plaquegereinigtem Virusmaterial der 185. Passage des Stammes Rac H, geschnitten mit (1) Bam HI, (2) Eco RI, (3) Sal I, (4) Hind III, (5) Bam HI + Sal I, (6) KB-Ladder und (7) Lambda-Hind III und der 256. Passage geschnitten in der gleichen Reihenfolge (Bahn 8 bis 12)

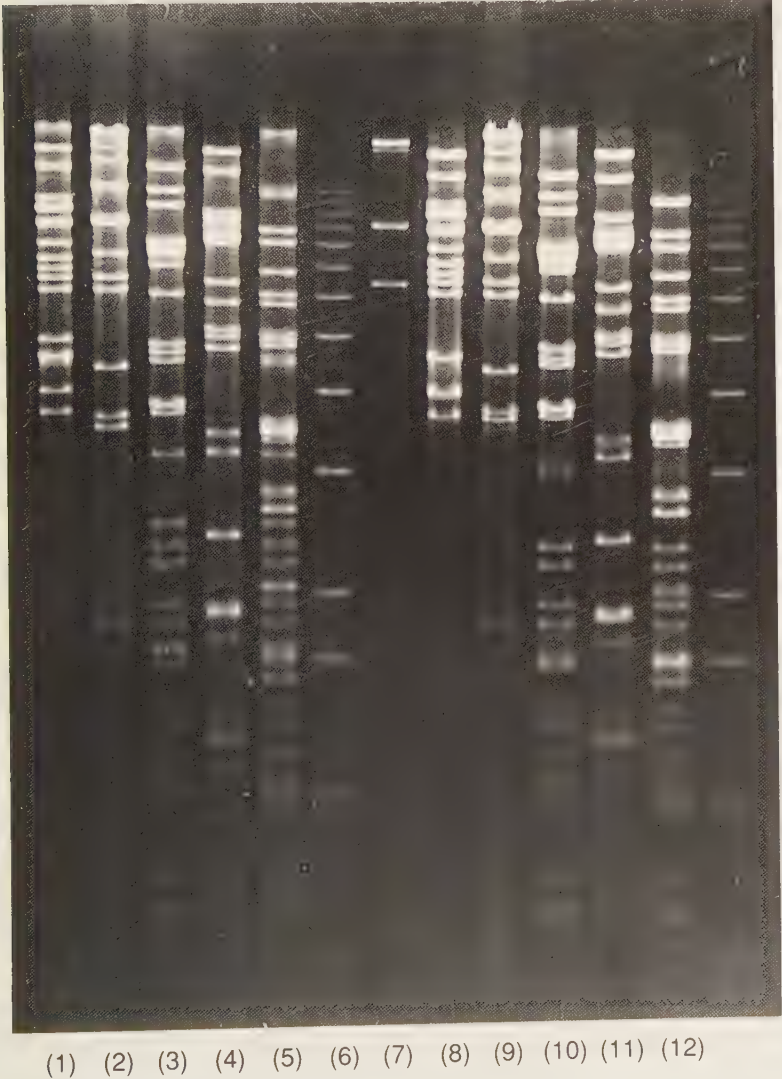
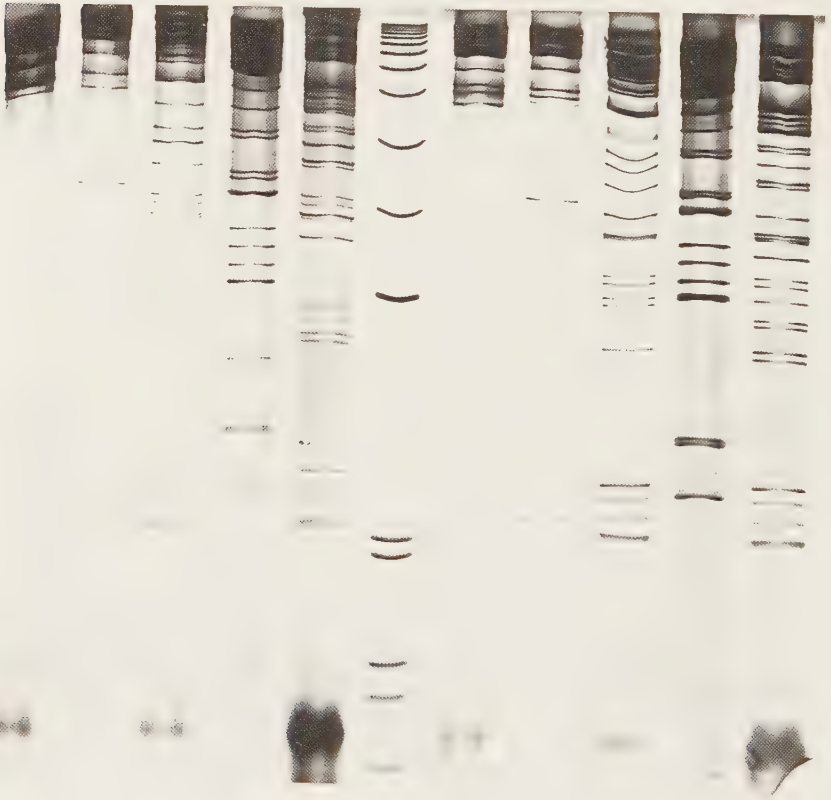


Abbildung 9: Auftrennung im Polyacrylamid-Gel

Die gleiche DNA-Präparation wie in Abbildung 4 in der gleichen Anordnung nach Auftrennung im 7,5% PA-Gel und anschließender Silberfärbung



Die Kentucky D Bam HI-Fragmente L und M (aus MN) reagieren beide mit einem Bam HI-Fragment von ca. 10 Kbp (DE), was etwa der Summe der beiden Fragmente L und M entspricht (Abbildung 12, B, C). Die anderen, aus der IR-Region stammenden Fragmente erkennen hauptsächlich Banden im Größenbereich von ca. 4,8 Kbp (M), 3,7 Kbp (R), 4,6 Kbp (OP) und 4,0 Kbp (Q) (Abbildung 12, C; Abbildung 13, A, C). Das rechte Ende des Genoms, repräsentiert durch das Fragment S, zeigt Homologie zu einem Fragment ähnlicher Größe (3,7 Kbp) und zu einem Fragment von etwa 9,5 Kbp, wo sich auch entsprechende Homologien mit dem Fragment E nachweisen lassen (Abbildung 13, D). Die Ergebnisse mit den selben Sonden auf Eco RI-Blots lassen keinerlei Unterschiede zu den aus der Literatur erwarteten Werten erkennen. Die in Abbildung 4 und im unteren Teil der Tabelle 2 dargestellten Hybridisierungen mit Sonden, hergestellt aus dem IR-Bereich von Rac H (256.P.) auf drei plaquegereinigte Subpopulationen von Rac H (185.P.) sind in zwei Gruppen einzuteilen. Die mit MNO bezeichnete Sonde reagiert mit zwei Banden von 4,6 und 4,8 Kbp Größe (NOP und Q). Die als PQ und R bezeichneten Sonden reagieren beide mit Fragmenten der Größe 4,8 und 2,8 Kbp (NOP und Q). Zusätzlich ist ein deutliches Signal bei 9,5 Kbp (FG) zu erkennen, wo homologe Sequenzen der Fragmente E bzw S zu erwarten sind. Beim Isolat P2 erscheint keine Bande mit 3,8 Kbp im Gel und läßt sich auch nicht in der Hybridisierungsreaktion nachweisen. Das Isolat P3 besitzt kein Fragment von 4 Kbp Größe. Homologien sind dafür mit einem Fragment von ca. 4,8 Kbp (NOP) nachweisbar.

3.2.2. Physikalische Genkarte des EHV 1-Stammes Rac H

3.2.2.1. Physikalische Genkarten der 12., 185. und 256. Passage des Stammes Rac H für Bam HI

Die international anerkannte physikalische Genkarte für EHV 1 (Whalley et al., 1981) war Grundlage für den hier beschriebenen Versuch, physikalische Genkarten für das Genom der 12., 185. und 256. Passage des EHV 1-Stammes Rac H anzulegen.

Die Abbildung 1 zeigt in Bahn 5 mit der Restriktionsendonuklease Bam HI geschnittene DNA des EHV 1-Stammes Kentucky D. Die DNA-Fragmente A, B, F/G, H, I, J und K entsprechen in ihren Laufstrecken den DNA-Fragmenten, die in den Bahnen 1 bis 4 zu sehen sind. Unterschiede treten auch hier hauptsächlich im unteren Bereich des Agarosegels, also bei den kleineren DNA-Fragmenten auf. Die Kentucky D-Fragmente E und FG stimmen ebenfalls nicht mit den DNA-Fragmenten in den Bahnen 1 bis 4 überein. Ein bei Kentucky D vorhandenes T-Fragment (2,5 Kbp) ist im DNA-Muster der 12., 185. und 256. Passage von Rac H nicht zu finden.

Zur Erstellung der genannten Genkarten mußten die DNA-Fragmente der verschiedenen Passagen des Stammes Rac H im unteren Bereich des Agarosegels den Fragmenten von Kentucky D zugeordnet werden. Dazu wurden weitere Hybridisierungen durchgeführt. Die in Frage kommenden Kentucky D-Fragmente wurden isoliert und gegen die vom Agarosegel aus Abbildung 8 auf Nitrozellulose-filter übertragenen DNA-Fragmente (Bam HI, Eco RI) der 185. Passage von Rac H hybridisiert (Abbildung 10-13). Außerdem wurde die DNA der rekombinanten EHV-Plasmide pHS 01, pHS 02 und pHS 03 gegen die DNA-Fragmente aus Abbildung 8 hybridisiert. Die Reaktionen der Kentucky D-Fragmente L bis S wurden im Abschnitt 3.2.1.3. und in der Tabelle 2 dargestellt. Eine Übersicht der durchgeführten Hybridisierungsreaktionen ist in Tabelle 3 dargestellt. Die übrigen Fragmente (ABB. 10, A-C; ABB. 11, C-E; ABB. 12, A) zeigten der bekannten physikalischen Genkarte (Whalley et al., 1981) entsprechende Hybridisierungsreaktionen (Fragment Ky.-A mit Rac H-A, -B mit -B, -C mit -C, -H mit -H, -I mit -I, -J mit -J, -K mit -K). Die physikalischen Genkarten der 12., 185. und 256. Passage von Rac H für Bam HI sind in Abbildung 15 dargestellt.

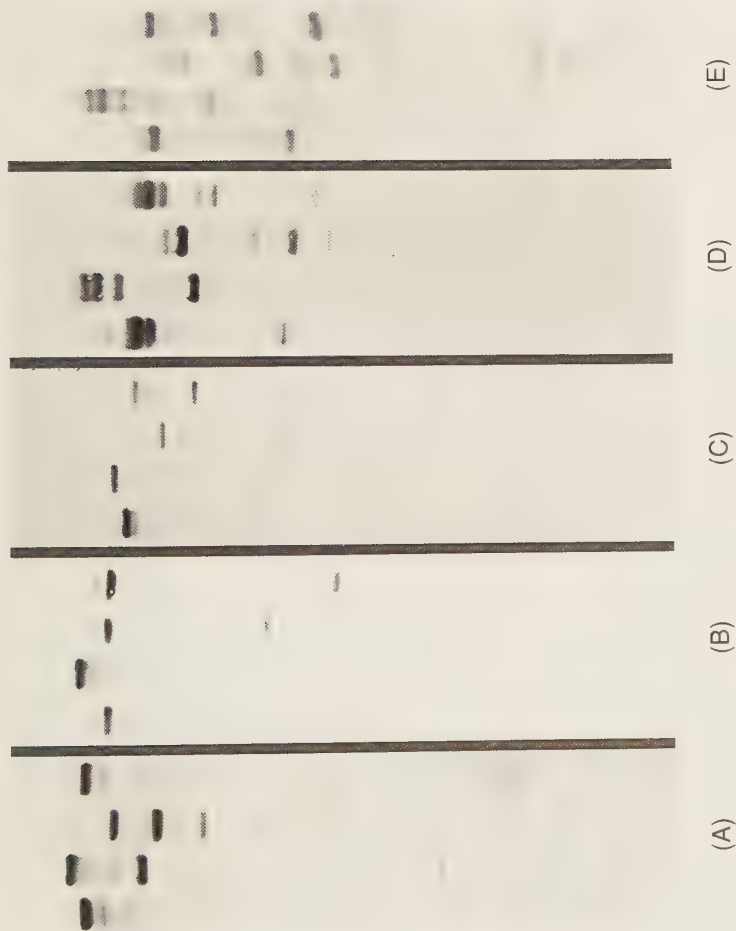


Abbildung 10: Hybridisierung von Kentucky D -Bam HI-Fragmenten gegen Rac H 185. P. (P1) (Bam HI, Eco RI, Sal I, Hind III) aus Abbildung 4.
Kentucky D A-Fragment (A), B-Fragment (B), C-Fragment (C), D-Fragment (D), E-Fragment (E)

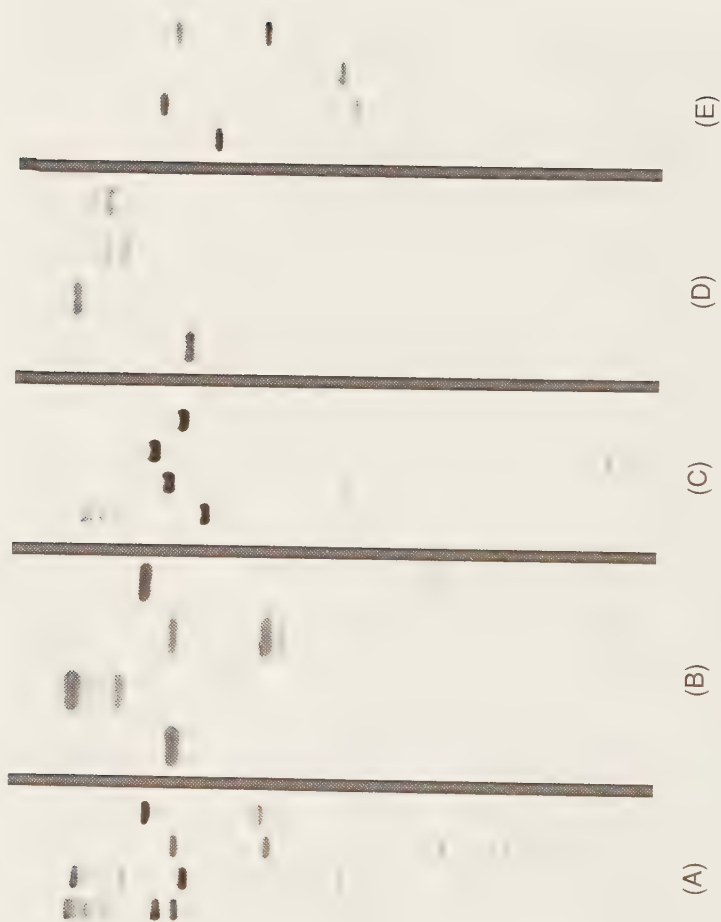


Abbildung 11: Hybridisierung von Kentucky D -Bam HI-Fragmenten gegen Rac H 185. P. (P1) (Bam HI, Eco RI, Sal I, Hind III) aus Abbildung 4.
 Kentucky D F/G-Fragment (A), F-Fragment (pHS 01) (B), H-Fragment (C), I-Fragment (D), J-Fragment (E)

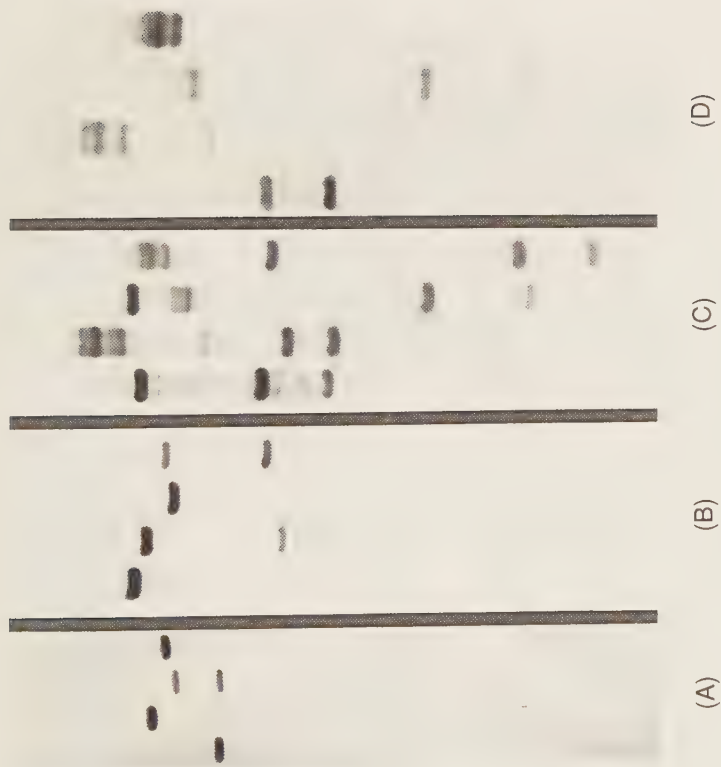


Abbildung 12: Hybridisierung von Kentucky D -Bam HI-Fragmenten gegen Rac H 185. P. (P1) (Bam HI, Eco RI, Sal I, Hind III) aus Abbildung 4.
Kentucky D K-Fragment (A), L-Fragment (B), M/N-Fragment (C), N-Fragment (pHS 02) (D)

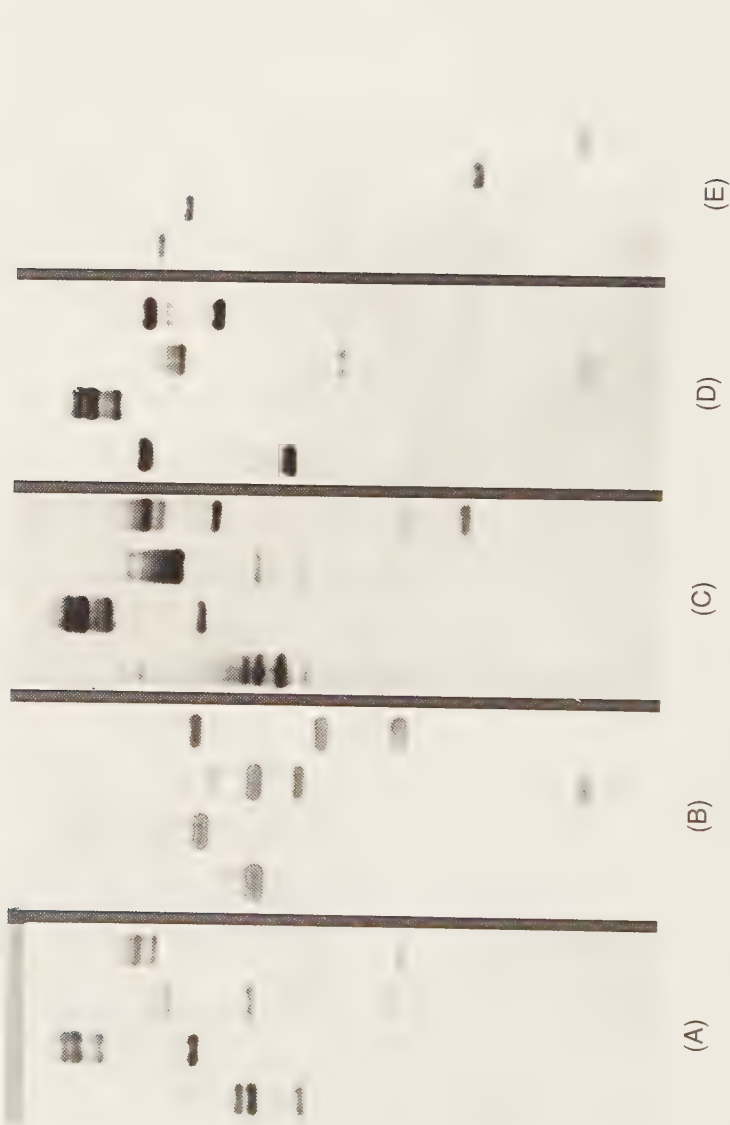


Abbildung 13: Hybridisierung von Kentucky D -Bam HI-Fragmenten gegen Rac H 185. P. (P1) (Bam HI, Eco RI, Sal I, Hind III) aus Abbildung 4.
 Kentucky D O/P-Fragment (A), O-Fragment (pHS 03) (B), Q/R-Fragment (C), S-Fragment (D),
 T-Fragment (E)

Kentucky D Bam HI Fragmente									
D	E	FG	pHS 01	L	MN	pHS 02	OP	pHS 03	QR S T
hybridisieren mit:									
BAM HI-Fragmenten:									
DE FG (Q)	DE Q	(A) DE FG	FG	DE	DE M (R)	N R	M NOP R	NOP	M NOP Q FG Q FG
Eco RI-Fragmenten:									
B CD EF K	B CD EF L	A A EF GHI O	A EF	GHI M	B CD EF (K) M N	B DC EF K	B CD (EF) L	L	B CD L CD (EF) J

Tabelle 3: Übersicht über die zur Erstellung der physikalischen Genkarten für die 12., 185. und 256. Passage des

EHV 1-Stammes Rac H durchgeführten Hybridisierungsreaktionen

Biotinmarkierte Bam HI-Fragmente von EHV 1 Kentucky D-DNA bzw. biotinmarkierte DNA der rekombinanten Plasmide pHS 01, pHS 02 und pHS 03 wurden mit Nitrozellulose-Blots von Rac H-DNA (185.P.) nach Schneiden mit Bam HI bzw. Eco RI hybridisiert. Die erste Zeile gibt die markierten Fragmente an, die Buchstaben in den darunterstehenden Spalten die Fragmente der jeweiligen Spaltung, mit denen Homologien festgestellt werden konnten. Schwache Färbung ist durch Klammern angezeigt.

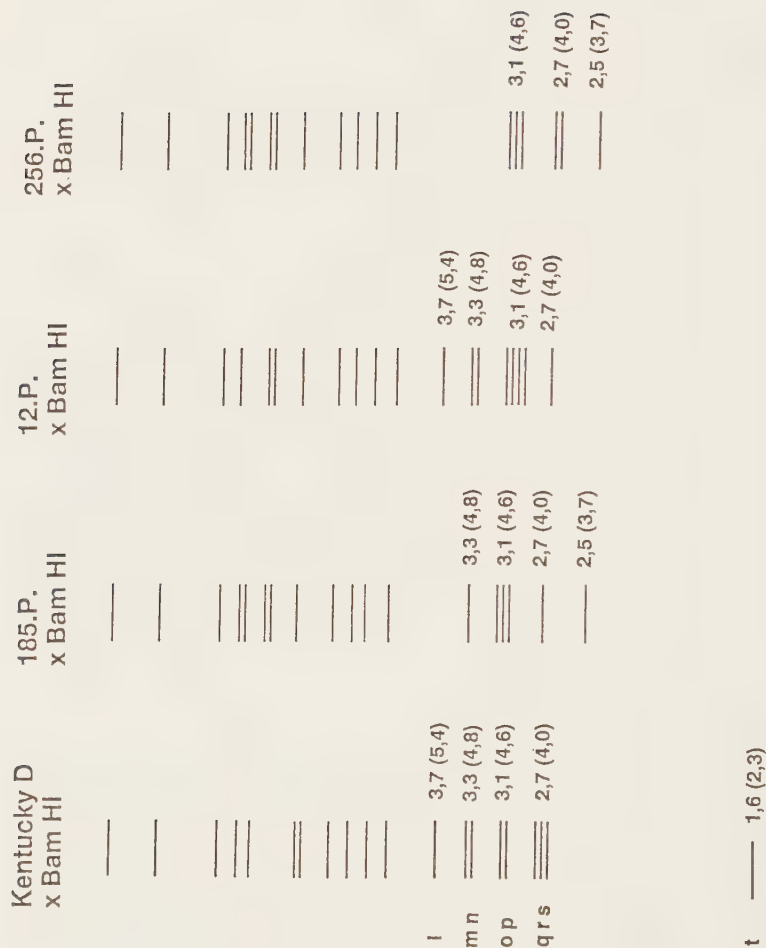


Abbildung 14: Molekulargewichte der Bam HI-DNA-Fragmente aus Abbildung 1 in MD (Kbp)
 (1) Kentucky D als Standard, (2) 185. P., (3) 12. P., (4) 256. P.



Abbildung 15: Physikalische Genkarten der 12., 185. und 256. Passage des EHV 1-Stammes Rac H für Bam HI

3.2.2.2. Physikalische Genkarten der 185. Passage des Stammes Rac H für Hind III und Sal I

Mit auf Nitrozellulosefilter übertragenen DNA-Fragmenten aus dem oben beschriebenen Agarosegel (Abbildung 8) wurden biotinmarkierte Kentucky D-Fragmente und die DNA der Plasmide pHS 01, 02 und 03 hybridisiert (Abbildung 10-13). Von besonderem Interesse waren auch hier die Fragmente der Inverted Repeat Region. Das Bam HI E-Fragment hybridisierte mit Sal I-Fragmenten von 4,7, 3,2 und 1,3 Kbp Größe bzw Hind III-Fragmenten von 6,3, 4,0 und 2,3 Kbp Größe. Die Fragmente OP und QR reagierten mit Sal I-Fragmenten der Größen 7,4, 4,7, 2,5 und 1,8 Kbp bzw Hind III-Fragmenten der Größen 6,3, 5,8 und 1,6 Kbp. Zur Unterscheidung der homologen Fragmente, die als Doppelbande M/N nach Schneiden mit Bam HI im Muster der EHV 1 Kentucky D-DNA isoliert worden waren, diente das Plasmid pHS 02 (siehe Abbildung 7-9). Während die M/N-Präparation aus dem Agarosegel mit Sal I-Fragmenten der Größen 7,9, 5,6, 1,7 und 1,2 Kbp bzw Hind III-Fragmenten der Größen 6,3, 5,8, 3,3 und 0,8 Kbp Homologie zeigte, fanden sich pHS 02-spezifische Banden im Größenbereich von 5,0, 1,7, 1,2 und 0,4 Kbp bei Sal I bzw 6,3 und 5,8 Kbp bei Hind III. Das Bam HI S-Fragment erkannte Sal I-Fragmente von ca. 7,3, 3,2 und 1,3 Kbp Größe bzw Hind III-Fragmente von 6,3, 4,0 und 1,3 Kbp Größe aus der Inverted Repeat Region. Das Bam HI D-Fragment erkannte die Sal I-Fragmente der Größen 7,9, 7,3 und 3,8 bzw die Hind III-Fragmente der Größen 6,9, 6,3, 5,8, 4,0, 2,3 und 0,8 Kbp der Inverted Repeat Region. Die Größen der DNA-Fragmente von Rac H (185. P.) nach Schneiden mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Die Ergebnisse der durchgeführten Hybridisierungsreaktionen (für alle Bam HI-Fragmente) sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die physikalischen Genkarten der 185. Passage von Rac H für Sal I und Hind III sind in Abbildung 16 gezeigt.

Kentucky D Bam HI Fragmente												
A	B	C	D	E	FG	pHS 01	H	I	J	K	L	MN
hybridisieren mit:												
Sal I-Fragmenten:												
2	1	4/5	(4/5)	(6/7)	4/5	4/5	3	1	15	6/7	6/7	3
4/5	12	8	(6/7)	(8)	10	10	(15)	2	24	9		(6/7)
9		13/14	8	11	(12)	12	26		28			(8)
		19	(11)	(14)	18							17
			13/14	16	20							22/23
			(16)	27	21							(31/32)
			(19)	29	25							(29)
			(27)									(22/23)
			(28)									(29)
Hind III:												
1	2	3/4	3/4	5/6	3/4	3/4	7/8	(1)	7/8	3/4	7/8	5/6
(2)	15	(5/6)	5/6	10	12	16/17		2	11	22/23	13	7/8
22	16/17	9	7/8	14	(17)							(9)
24		19/20	9		18							(14)
			10									16/17
			14									19/20
			(16/17)									
			23/24									

Tabelle 4: Übersicht über die für die Erstellung der physikalischen Genkarten des EHV 1-Stammes Rac H (185. Passage) durchgeführten Hybridisierungsreaktionen

Biotinmarkierte Bam HI-Fragmente von EHV 1 Kentucky D-DNA bzw der Plasmide pHS 91, 02 und 03 wurden mit Nitrozellulose-Blots von Rac H-DNA (185 P.) nach Schneiden mit Sal I bzw Hind III hybridisiert. Die erste Zeile gibt die markierten Fragmente an, die Buchstaben in den darunterstehenden Spalten die Fragmente, mit denen Homologien festgestellt werden konnten. Schwache Färbung ist durch Klammern angezeigt.

Tabelle 5:

Fragmentgrößen (in MD) von EHV 1 Rac H (185.P.) DNA nach Schneiden mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III

Frag.- Nr.:	Enzym : Sal I	Nr.:	Enzym : Hind III
1	10,6	1	12,9
2	8,7	2	10,8
3	7,9	3	6,9
4	6,0	4	6,9
5	6,0	5	6,3
6	5,6	6	6,3
7	5,6	7	5,8
8	5,0	8	5,8
9	4,2	9	4,5
10	3,3	10	4,0
11	3,2	11	3,6
12	3,1	12	3,4
13	2,6	13	3,3
14	2,6	14	2,3
15	2,4	15	2,1
16	2,2	16	1,6
17	1,7	17	1,6
18	1,6	18	1,3
19	1,5	19	1,3
20	1,4	20	1,3
21	1,3	21	1,2
22	1,2	22	0,9
23	1,2	23	0,8
24	1,1	24	0,8
25	1,0	25	0,7
26	0,9	26	0,6
27	0,8	27	0,4
28	0,7		
29	0,7		
30	0,5		
31	0,4		
32	0,4		

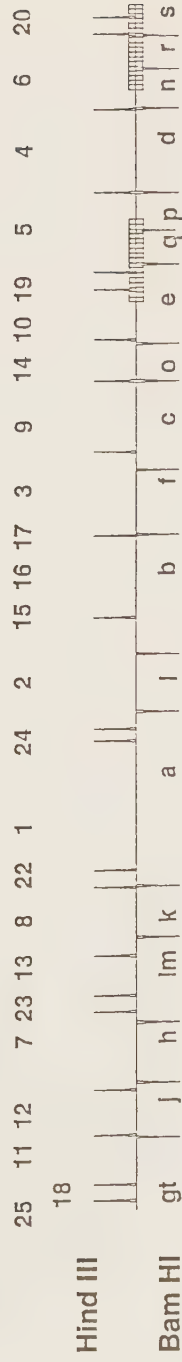


Abbildung 16: Physikalische Genkarte der 185. Passage des EHV 1-Stammes Rac H für Sal I und Hind III.

Bereits im Übersichtsgel (ABB. 1) fällt auf, daß die Laufstrecken der kleinen Fragmente mit zunehmender Attenuierung größer werden. Die auffälligste Veränderung betrifft das 5,4 Kbp große L-Fragment der 12. Passage, welches als 1-molare Bande sichtbar ist. Weiterhin tritt anstelle einer Doppelbande bei der 12. Passage, bestehend aus den jeweils 4,8 Kbp großen Fragmenten M und N, bei den späteren Passagen nur noch eine Einfachbande auf (ABB. 1).

Die Ursache für diese Veränderungen ist in einer Mutation zu sehen, die einen Verlust der Bam HI Schnittstelle zwischen dem L- und dem M-Fragment (map unit 0,19) der 12. Passage zur Folge hat. Es entsteht dafür ein neues Fragment von ca. 10,3 Kbp, welches ab der 185. Passage als zusätzliche Bande zu erkennen ist (ABB. 1) und auch Homologie mit den beiden fehlenden Banden besitzt (ABB. 10, D).

Eine weitere bereits von Chowdhury et al. (1987) für andere Isolate beschriebene Veränderung betrifft das linke Genomende. Der Stamm Rac H zeigt im Vergleich mit dem Wildtypstamm Kentucky D einen Verlust von etwa 0,8 Kbp, wobei auch eine Bam HI-Schnittstelle verschwindet. Die von Whalley et al. (1981) dem Bam HI-T-Fragment zugeordnete Bande im Agarosegel geht bei Rac H damit verloren.

In der ABB. 1 ist außerdem die Folge einer Virus-Passagierung auf heterologen Zellkulturen zu erkennen. Die auf Kaninchenzellen vermehrte 185. Passage (3) ist deutlich als inhomogene Population zu erkennen. Allen et al. (1983 a) und Studdert et al. (1986) beschrieben typische Veränderungen insbesondere in den IR-Bereichen von EHV nach Passagieren über Zellkulturen. Geringgradige Veränderungen sind auch bei Verwendung von equinen Zellen beschrieben und treten schon nach wenigen Passagen auf. Bei Passagen über nicht-equine Zellen sind die Unterschiede jedoch wesentlich größer und werden auf einen selektiven Vorteil von Subpopulationen, die vorher nicht in Erscheinung getreten waren, zurückgeführt. Auch bei Rac H ist eine deutliche Änderung des Schnittmusters nach der Passage über die Kaninchennierenzellkultur (RK₁₃) zu erkennen. Die submolaren Banden im Muster des Ausgangsmaterials deuten ebenfalls auf einen Selektionsmechanismus hin. Die von O'Callaghan et al. (1978) und Allen et al. (1983 a, b) weiter beschriebenen deutlichen Veränderungen nach hohen Passagezahlen über Fremdzellkulturen sind jedoch nicht erkennenbar. Die Veränderungen betreffen wie bei den Passagen über homologe Zellsysteme im wesentlichen den IR-Bereich.

Die markantesten Veränderungen im Genom des Stammes Rac H treten in der Inverted Repeat Region auf und umfassen zwei Deletionen von jeweils ca. 0,8 Kbp. Eine davon ist vor und eine nach der 185. Passage des EHV Stammes Rac H zu beobachten. Die Verluste betreffen jeweils Sequenzen innerhalb der Bam HI-Fragmente am Übergang zum Unique Short Teil des Genoms. Damit grenzen sie sich eindeutig von den Deletionen ab, die bei DIPs beobachtet werden (Gray et al., 1987). Bei diesen treten Deletionen in den im Mittelbereich der IR-Region liegenden Bam HI-Fragmenten auf.

Die zur Interpretation der aufgetretenen Veränderungen notwendige Erstellung einer genauen physikalischen Genkarte für den EHV 1-Stamm Rac H basiert auf den von Whalley et al. (1981) veröffentlichten Daten. Dabei wurde zu Grunde gelegt, daß das von Whalley et al. (1981) analysierte EHV 1 Isolat HVS 25 mit dem in dieser Arbeit verwendeten Referenzstamm Kentucky D weitgehend identisch ist (Allen et al., 1983a). Die große Ähnlichkeit der EHV 1-Stämme Kentucky D und Rac H (185. P.) im Restriktionsenzymmuster nach Schneiden mit dem Enzym Bam HI läßt es berechtigt erscheinen, die von Henry et al. (1981) vorgeschlagene Genkarte nicht anzuwenden, obwohl auch im vorliegenden Fall Virusmaterial nach hohen Fremdzellpassagen kartiert werden sollte. Die Anordnung der Bam HI-Fragmente aus dem konstanten Bereich der U_L- und U_S-Region wurde aus der Literatur (Whalley et al., 1981) übernommen. Somit mußten hier lediglich die Schnittstellen für die Enzyme Sal I und Hind III eingetragen werden. Die Benennung durch Buchstaben war aufgrund der großen Zahl an nachweisbaren Fragmenten (für Sal I 32, für Hind III 25) nicht durchführbar. Die Sal I- bzw Hind III-Fragmente wurden entsprechend ihrer Homologie zu den Bam HI-Fragmenten der übernommenen Genkarte eingeordnet. Nicht überlappende Fragmente konnten nicht exakt zugeordnet werden und wurden lediglich als Zahl in die Karte eingetragen, ohne die genaue Lokalisation anzugeben. Zur genauen Abklärung müßten diese Fragmente als klonierte DNA aus der "genomic library" isoliert und, wie für pHS 02 geschehen, durch Subklonieren und Schneiden mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen feinkartiert werden. Subklonierte DNA-Fragmente wurden nur von Fragmenten isoliert, die im Agarosegel nur als Doppelbanden sichtbar waren. Für die vorliegende Arbeit war insbesondere der Bereich der IR-Region von Bedeutung. Das Plasmid pHS 02 nahm daher aufgrund der beinhalteten IR-Sequenzen eine besondere Stellung ein.

Die Fragmentgrößen im IR-Bereich des EHV 1-Stammes Rac H unterschieden sich nach der 12., 185. und 256. Passage und außerdem vom Referenzstamm Kentucky D. Daher mußte die Karte für die Bam HI-Schnittstellen in diesem Bereich neu bestimmt werden. Die Größe des

E-Fragments blieb unverändert. Daraus konnte geschlossen werden, daß auch der dem U_L -Segment zugewandte Teil der IR-Region konstant geblieben war. Über einen im U_L -Teil dieses Fragments liegenden heterogenen Bereich repetitiver DNA-Sequenzen wurde von Baumann et al. (1987) berichtet. Mittels PAGE konnten geringe Variationen nur in der het-Region des Stammes Rac H nach der 256. P. nachgewiesen werden, die sich in Abbildung 9 (Bahn 10) in Form mehrerer aufeinander folgender, submolarer Banden darstellte. Die Größe des Bam HI-Fragments, welches das rechte Genomende repräsentiert, blieb ebenfalls konstant. Der Grund ist in der Isomerie der beiden auftretenden kurzen Segmente zu sehen, wobei der IR-Teil des E-Fragments in 50% der Population das rechte Ende des Genoms darstellt.

Die Größe der jeweils in der Mitte der IR-Region liegenden Bam HI-Fragmente stimmt mit den in der Karte von Whalley et al. (1981) vorgegebenen Werten nicht überein. Während in der beschriebenen Karte die beiden Mittelteile mit 2,7 MD (ca. 4,0 Kbp) angegeben waren, stellten sie sich bei Rac H nach der 12. Passage mit jeweils 4,6 Kbp dar. Die Größe der beiden anderen, dem U_S -Bereich zugewandten Fragmente entspricht der in der Literatur beschriebenen. Die beiden neu auftretenden Banden von Rac H der 185. Passage erweisen sich nach der Plaquereinigung als zwei verschiedenen Populationen zugehörig. Zum einen findet sich bei der als P1 bezeichneten Subpopulation nur ein dem Mittelteil der IR-Region homologes Fragment von 4,6 Kbp, während bei den mit P2 und P3 benannten Subpopulationen Banden mit 4,6 und 4,0 Kbp reagieren. Zum anderen ist bei den Versionen P1 und P3 ein 3,7 Kbp großes Fragment zu erkennen, das mit den aus Rac H 256. P. isolierten Bam HI-Fragmenten von 4,0 und 3,7 Kbp Homologie besitzt. Die Hybridisierung mit dem Plasmid pHS 02, welches das klonierte Bam HI N-Fragment (in der ursprünglichen Bezeichnung) enthält, führte zum gleichen Ergebnis. Aufgrund der Homologie von pHS 02 zum Eco RI K-Fragment kann davon ausgegangen werden, daß es sich hier um das in pBR 322 klonierte, von Whalley et al. (1981) als N-Fragment bezeichnete Fragment von EHV 1 Rac H der 185. Passage handelt. Da in allen untersuchten Plaques von Rac H (185. P.) bereits eines der beiden Fragmente verkürzt erschien, muß es sich dabei also um das ursprünglich mit P bezeichnete Fragment handeln. Damit zeigt sich eine Verkürzung des an die U_S -Region anschließenden Bam HI P-Fragmentes von 4,6 auf 3,7 Kbp. Da sich der Typ P1 häufiger als die übrigen, isolierten Typen und auch nach limiting dilution Reinigung darstellen ließ, wird davon ausgegangen, daß er bereits einen gewissen Selektionsvorteil hatte. Eine Funktion der Subpopulation P1 als Vorgängerstufe von Rac H (256. P.) ist somit naheliegend. Dafür spricht auch, daß aus dem Typ P1 durch eine einzige weitere Deletion im dem veränderten Fragment gegenüberliegenden Teil (Bam HI M-Fragment) der

Elektropherotyp von Rac H (256. P.) entstehen könnte. Um den Typ P3 als Vorläufer zu erwägen, müßte zuerst die Verkürzung eines der beiden Mitteleile von 4,6 auf 4,0 Kbp und des P-Fragments auf 3,7 Kbp eintreten. Nachfolgend sollte eine Verkürzung des N-Fragments auf 4,6 Kbp und die Verlängerung des zuvor verkürzten Mittelteils auf die ursprüngliche Größe von 4,6 Kbp zum Typ des Rac H 256. P. führen. Dies erscheint unwahrscheinlich. Das gleiche gilt für eine mögliche Verschiebung der Schnittstelle zwischen dem Bam HI Q- und dem P-Fragment (in ihrer ursprünglichen Benennung) um ca. 0,9 Kbp, was auch vom Typ P3 zum Typ des Rac H 256. P. führen könnte. Eine dabei auftretende zwischenzeitliche Homologie benachbarter Fragmente ist nicht nachweisbar. Die Veränderung der physikalischen Genkarte von Rac H während der Attenuierung stützt sich daher auf die Annahme, daß sich aus der heterogenen Population der 12. Passage, die im wesentlichen dem von Whalley et al. (1981) vorgestellten Elektropherotyp entspricht, die Variante, als P1 bezeichnet, und daraus der entgültige Typ, wie er sich nach der 256. Passage darstellt, entwickelt hat.

Die oben beschriebenen Veränderungen im Genom des EHV 1 können anhand eines Vergleichs mit der hier aufgestellten physikalischen Genkarte für Sal I bzw dem DNA-Muster aus Abbildung 5 für Sal I bestätigt werden. In der Inverted Repeat Region der 185. Passage von Rac H gefundene Sal I-Fragmente von 3,2 Kbp (2,2 MD) und 2,5 Kbp (1,7 MD) Größe sind im DNA-Muster der 256. Passage nicht mehr zu finden. Ein weiteres Sal I-Fragment aus der Inverted Repeat Region von ca. 1 Kbp Größe erscheint ebenfalls verändert. Dies bestätigt die Veränderungen in Form der beschriebenen Deletion von 0,8 Kbp in der Inverted Repeat Region vor der 256. Passage von Rac H. Im Hind III-DNA-Muster sind entsprechende Veränderungen nicht deutlich zu erkennen. Die im PA-Gel anstelle einer 1 molaren Bande nach der 185. Passage zu findenden submolaren Banden nach der 256. Passage sprechen für einen heterogenen Bereich im Genom des EHV 1, der auch von Baumann et al. (1987) beschrieben wurde. Die Existenz einer einzigen Bande beim plaquegereinigten Isolat ist dabei als Hinweis auf die Güte der Reinigung zu werten.

Der Virulenztest in Hamstern hatte die für die 12. und 256. Passage erwarteten, der Literatur (Mayr et al., 1968) entsprechenden, Ergebnisse. Der Infektionsversuch mit Virusmaterial des plaquegereinigten Stammes Rac H nach der 185. P. (Typ P1) läßt lediglich erkennen, daß die Virulenz unterhalb des Meßbereiches liegt. Die Restvirulenz müßte durch eine Virustitration beurteilt werden. Sie liegt jedoch, soweit sie mit einem einmaligen Versuch abgeschätzt werden kann, unter der von Mayr et al. (1968) für die Mischpopulation ermittelten H₅₀. Damit ist die Annahme berechtigt, daß der verwendete plaquegereinigte Stamm Rac H avirulent

ist. Die in der Mischpopulation beobachtete Restvirulenz wird von noch nicht untersuchten Subpopulationen hervorgerufen. Zur weiteren Charakterisierung müssen daher mit weiteren Plaques, auch aus der Rac H Population nach der 12. P., Titrations in Hamstern vorgenommen werden.

Deletionen in den Inverted Repeat Regionen sind für die Beurteilung der Virulenz von besonderer Bedeutung. Die unmittelbar nach der Infektion aktivierten IE-Gene (map unit 0,78-0,83 und 0,95-1,00) des EHV 1 Genoms sind in diesem Bereich lokalisiert (Gray et al., 1987; Baumann et al., 1987). Diese sind für einen vollständigen Infektionsablauf und damit für die komplette Virus-Replikation verantwortlich. Ein Verlust von IE-Gensequenzen könnte demnach zu der beschriebenen Virulenzabschwächung bzw dem vollständigen Virulenzverlust des Stammes Rac H geführt haben. Der schrittweise Virulenzverlust würde also durch ein schrittweises Verlorengehen der entsprechenden Sequenzen erklärt werden. In Übereinstimmung damit konnte auch beim HSV 1 ein Virulenzverlust unter anderem auf Defekte in der IRL Region zurückgeführt werden (Rösen et al., 1985; 1986).

Für die IR Region wäre, wie es beim Humanen Cytomegalievirus diskutiert wird (Boom et al., 1987), außerdem eine Enhancer-Funktion bei der Virusreplikation vorstellbar. Durch die Bildung von sogenannten "loops" im IR Bereich könnte ein solcher Verstärker-Effekt auf die Transkription erklärt werden (Knippers, 1985).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen zwar deutlich die Auswirkung der Attenuierung auf das Genom des EHV 1-Stammes Rac H, machen jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Die Sequenzierung bestimmter Genombereiche, wie der Inverted Repeat Region, ist unerlässlich zur funktionellen Analyse regulativer Abschnitte. Dazu sollen neben dem bereits in pHS 02 klonierten IR-Fragment auch die entsprechenden Fragmente aus Varianten mit Deletionen kloniert, in M13-Phagen subkloniert und die Unterschiede in der Nukleotidsequenz ermittelt werden. Rekombinationsversuche avirulenter Stämme mit isolierten Fragmente aus virulenten Plaquepopulationen und umgekehrt werden weiteren Aufschluß über die für die Virulenz verantwortlichen Genloci geben.

5. Zusammenfassung

Vom Equinen Herpesvirus Typ 1 (EHV 1) Stamm Rac H standen drei Varianten mit unterschiedlich hoher Passagezahl (12., 185. und 256. P.) zur Verfügung.

In den Restriktionsenzym-Analysen erwiesen sich die Viruspopulationen der beiden niedrigen Passagen als heterogen. Die Bandenmuster plaquegereinigter Subpopulationen aus Virusmaterial der 185. Passage ließen die Zusammensetzung aus mindestens drei verschiedenen Elektropherotypen erkennen. Der am häufigsten isolierte Typ P1 (185. P.) wurde im Virulenztest verwendet und zeigte keinen Unterschied zu der als Impfstamm verwendeten Variante aus der 256. Passage.

Weiterhin wurde die Anordnung der Restriktionsfragmente im Genom in Form von physikalischen Genkarten für Bam HI, Eco RI, Sal I und Hind III erstellt. Hierzu mußten von Fragmenten, die im Gel nicht von anderen Banden getrennt dargestellt werden konnten, DNA-Klone in *E. coli* (pBR 322) hergestellt werden. Mit diesen und den übrigen, aus Agarosegelen isolierten DNA-Fragmenten, wurde die Zuordnung homologer Bereiche der verwendeten Virusstämme in Hybridisierungsexperimenten vorgenommen.

Die erstellte Genkarte für Bam HI läßt im Genom des EHV 1-Stammes Rac H folgende Veränderungen erkennen:

1. Das linke Genomende von Rac H zeigt eine Abweichung von dem des Wildtypstammes Kentucky D. Bei einem Sequenzverlust von etwa 0,8 Kbp ging auch eine Schnittstelle für das Enzym Bam HI verloren.
2. Bei map unit 0,2 ging, jedoch ohne erkennbare Sequenzverluste, ebenfalls eine Schnittstelle für das Enzym Bam HI verloren, was zum Auftreten einer neuen DNA-Bande führte. Diese Veränderung trat vor der 185. Passage auf.
3. In den Inverted Repeat Regionen traten an zwei Stellen Deletionen auf, eine von ca. 0,8 Kbp vor der 185. Passage und eine weitere von ca. 0,8 Kbp vor der 256. Passage.

Die Anordnung der Schnittstellen für die Enzyme Sal I und Hind III in der Genkarte bestätigt die oben beschriebenen Veränderungen.

6. Summary

The genome of equine herpesvirus type 1 (EHV 1) strain Rac H and its alteration during attenuation.

Three variants of EHV 1 strain Rac H at different passage numbers were available. Restrictionenzyme analysis revealed the two low passaged populations as heterogeneous. Plaquepurification of the pool at 185th passage showed at least three electrophoretically different subpopulations. The most frequently isolated type was proved to be as avirulent in suckling hamsters as a preparation of Rac H at the 256th passage, which is used as vaccine strain.

Changes in restrictionenzyme pattern were documented as physical maps for Bam HI, Eco RI, Sal I and Hind III sites. On comparison with each other and with reference strain Kentucky D Bam HI-digested DNA-fragments were isolated from agarose gels and subjected to hybridization as biotin labelled probes. Fragments, that could not be separated electrophoretically, were cloned in *E. coli* (pBR 322) before being used as probes.

The resulting Bam HI map showed following changes in the genome of EHV 1 strain Rac H:

1. The left end of the genome of Rac H differs from that of wildtype strain Kentucky D. The loss of 0.8 kbp is coincident with the loss of a Bam HI restriction site.
2. At map unit 0.2 another Bam HI restriction site disappeared without any detectable deletion. This happened before 185th passage.
3. Two additional deletions occurred in the U_S-adjacent IR-parts of 0.8 kbp each. It could be demonstrated that one happened before 185th passage and the other one before 256th passage.

7. Literaturverzeichnis

- ALLEN G.P., J.T. BRYANS, 1986:
Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections.
Prog. Vet. Microbiol. Immun., **2**, 78-144.
- ALLEN G.P., L.W. TURTINEN, 1982:
Assessment of the base sequence homology between the two subtypes of equine herpesvirus 1.
J. Virol. **44**, 249-255.
- ALLEN G.P., M.R. YEARGAN, J.T. BRYANS, 1983a:
Alterations in the equine herpesvirus 1 genome after in vitro and in vivo virus passage.
Infect. Immun. **40**, 436-439.
- ALLEN G.P., M.R. YEARGAN, L.W. TURTINEN, J.T. BRYANS, W.H. MCCOLLUM, 1983b:
Molecular epizootologic studies of equine herpesvirus-1 infections by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA.
Amer. J. Vet. Res. **44**, 263-271.
- BAUMANN R.P., J. STACZEK, D.J. O'CALLAGHAN, 1987:
Equine herpesvirus type 1 defective interfering (di) particle dna structure: the central region of the inverted repeat is deleted from DI DNA.
Virology **159**, 137-146.
- BOOM R., J.L. GEELLEN, C.J. SOL, R.P. MINNAAR, J.v.d. NOORDAA, 1987:
Resistance to methylation de novo of the Human Cytomegalovirus immediate early enhancer in a model for virus latency and reactivation in vitro.
J. gen. Virol. **68**, 2839-2852.
- BORGEN H.C., 1972:
Equine herpesvirus type 1; the I-character in two of forty-three field isolates.
Arch. Ges. Virusforsch. **36**, 391-393.
- BRYANS J.T., 1981:
Application of management procedures and prophylactic immunization to the control of equine rhinopneumonitis.
26th Annu. Conf. Am. Ass. Equine Practitioners, Anaheim, 259-272.

- BRYANS J.T., G.P. ALLEN, 1981:
Application of chemically inactivated, adjuvanted vaccine to control of abortigenic infection of mares by equine herpesvirus 1.
17th Int. Congr. Herpesviruses of man and animal, Lyon, 493-498.
- BRYANS J.T., G.P. ALLEN, 1984:
Control of abortigenic herpesviral infections.
Curr. Ther. Theriogenol.
- BUREK J.D., R.P. ROOS, O. NARAYAN, 1975:
Studies of equine herpesvirus 1 (abortion virus) in hamsters.
Lab. Invest. **33**, 400-406.
- BURROWS R., D. GOODRIDGE, 1972:
In vivo and in vitro studies of equine rhinopneumonitis strains.
3rd Int. Conf. of Equine Infect. Dis., Paris, 306-321.
- CHOWDHURY S.I., G. KUBIN, H. LUDWIG, 1986:
Equine herpesvirus type 1 (EHV 1) induced abortions and paralysis in a Lipizzaner stud: a contribution to the classification of equine herpesviruses.
Arch. Virol. **90**, 273-288.
- CHOWDHURY S.I., G. ROCKBORN, B. KLINGEBORN, P. THEIN, H. LUDWIG, 1986:
Molecular epidemiology of equine herpesvirus type 1 (EHV 1) in non-equine hosts.
9th Int. Symp. Infect. Reprod. Syst. Domest. Animal. Spec., Perugia.
- DAUENHAUER S.A., R.A. ROBINSON, D.J. O'CALLAGHAN, 1982:
Chronic production of defective interfering particles by hamster embryo cultures of herpesvirus persistently infected and oncogenically transformed cells.
J. gen. Virol. **60**, 1-14.
- DIMOCK W.W., P.R. EDWARDS, 1932:
Infection of fetuses and foals.
Suppl. Ky. Agr. Exp. Bull. **333**.
- DOLL E.R., J.T. BRYANS, 1963:
A planned infection program for immunizing mares against viral rhinopneumonitis.
Cornell Vet. **53**, 249-262.

- DOLL E.R., J.H. KINTNER, 1954 a:
A comparative study of the equine abortion and equine influenza viruses.
Cornell Vet. **44**, 355-367.
- DOLL E.R., M.G. RICHARDS, M.E. WALLACE, 1954 b:
Cultivation of the equine influenza virus in suckling Syrian hamsters: Its similarity to the equine abortion virus.
Cornell Vet. **44**, 133-137.
- GRAY W.L., R.P. BAUMANN, A.T. ROBERTSON, G.B. COUGHMAN, D.J. O'CALLAGHAN, J. STACZEK, 1987:
Regulation of equine herpesvirus type 1 gene expression: Characterization of immediate early, early, and late transcription.
Virology **158**, 79-87.
- HANAHAN D., M. MESELSON, 1980:
A protocol for high density screening of plasmids in x 1776.
Gene **9**, 27.
- HENRY B.E., R.A. ROBINSON, S.A. DAUENHAUER, S.S. ATHERTON, G.S. HAYWARD, 1981:
Structure of the genome of equine herpesvirus type 1.
Virology **115**, 97-114.
- HOLLAND J.J., 1985:
Generation and replication of defective viral genomes.in: Fundamental Virology, FIELDS B.N., D.M. KNIPE, Eds., New York, Raven Press, 77-99.
- HOLLAND J.J., L.C. MCLAREN, J.T. SYVERTON, 1959:
The mammalian cell-virus relationship. IV. Infection of naturally insusceptible cells with enterovirus nucleic acid.
J. Exp. Med. **110**, 65-80.
- JAVIER R.T., R.L. THOMPSON, J.G. STEVENS, 1987:
Genetic and biological analyses of a herpes simplex virus intertypic recombinant reduced specifically for neurovirulence.
J. Virol. **61**, 1978-1984.
- KAUFFMAN R.S., J.H. NOSEWORTHY, J.T. NEPOM, R. FINBERG, M.B. FIELDS, M.I. GREENE, 1983:
Cell receptors for the mammalian reovirus.
J. Immunol. **131**, 2539-2541.

- KLINGEBORN B., Z. DINTER, 1972:
Equine abortion (herpes) virus: strain differences in susceptibility to inactivation by dithiothreitol.
Appl. Microbiol. **23**, 1121-1124.
- KNIPPERS R., Ed. 1985:
Molekulare Genetik.
Stuttgart New York, Georg Thieme, 4. Auflage.
- LAZAROWITZ S.G., P.W. CHOPPIN, 1975:
Enhancement of the infectivity of influenza A and Bviruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide.
Virology **68**, 440-454.
- LOMNICZI B., A. GIELKENS, I. CSOBAL, T. BEN-PORAT, 1987:
Evolution of pseudorabies virions containing genomes with an invertible long component after repeated passage in chicken embryo fibroblasts.
J. Virol. **61**, 1772-1780.
- LOMNICZI B., A.S. KAPLAN, T. BEN-PORAT, 1987:
Multiple defects in the genome of pseudorabies virus can affect virulence without detectably affecting replication in cell culture.
Virology **161**, 181-189.
- LOMNICZI B., S. WATANABE, T. BEN-PORAT, A.S. KAPLAN, 1984:
Genetic basis of the neurovirulence of pseudorabies virus.
J. Virol. **52**, 198-205.
- MANIATIS T., E.F. FRITSCH, J. SAMBROOK, 1982:
Molecular cloning: a laboratory manual.
New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- MANNINGER R., J. CSONTOS, 1941:
Virusabortus der Stuten.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **49**.
- MAYR A., H.O. BÖHM, J. BRILL, S. WOYCIECHOWSKA, 1965:
Charakterisierung eines Stutenabortvirus aus Polen und Vergleich mit bekannten Rhinopneumonitisvirus-Stämmen des Pferdes.
Arch. Virol. **17**, 216-229.

- MAYR A., J. PETTE, K. PETZOLDT, K. WAGENER, 1968:
 Untersuchungen zur Entwicklung eines Lebendimpfstoffes gegen
 die Rhinopneumonitis (Stutenabort) der Pferde.
 Zbl. Vet. Med. Reihe B **15**, 406-418.
- MAYR A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK, G. WITTMANN, Eds. 1974:
 Virologische Arbeitsmethoden.
 Jena, VEB Gustav Fischer Verlag.
- MERILL C.R., D. GOLDMAN, S.A. SEDMAN, M.H. EBERT, 1981:
 Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional
 variation in cerebrospinal fluid proteins.
 Science **211**, 1437-1438.
- METTENLEITER T.C., C. SHREURS, H.J. THIEL, H.J. RZIHA, 1987:
 Variability of pseudorabies virus glycoprotein I expression.
 Virology **158**, 141-146.
- MEYER H., P.H. HÜBERT, W. EICHHORN, 1987:
 Changes in Restriction Enzyme Pattern of the Equine Herpesvirus
 Type 1 (EHV 1) Strain Rac-H DNA During Attenuation.
 J. Vet. Med. B **34**, 310-313.
- MOORE B.O., H.J. KOONSE, 1977:
 Inactivated equine herpesvirus 1 vaccine Pneumabort-K.
 24th Ann. Convent. Am. Ass. Equine Pract., 75-79.
- O'CALLAGHAN D.J., G.P. ALLEN, C.C. RANDALL, 1978:
 Structure and replication of equine herpesvirus.
 in: Equine infectious diseases, BRYANS J.T., H. GERBER, Eds.,
 Princeton New Jersey, Veterinary Publications IV 1-30.
- PATEL J.R., N. EDINGTON, 1983:
 The pathogenicity in mice of respiratory, abortion and paresis isolates
 of equine herpesvirus-1.
 Vet. Microbiol. **8**, 301-305.
- PERRAULT J., 1981:
 Origin and replication of defective interfering particles.
 Curr. Top. Microbiol. Immunol. **93**, 151-207.

ROIZMAN B., D. FURLONG, 1974:

The replication of herpesvirus.

in: Comprehensive virology, FRAENKEL-CONRAD H., R.R. WAGNER, Eds., New York, Plenum Press, Vol. **3**, 229-403.

RÖSEN A., G. DARAI, 1985:

Investigation of the virulence of herpes simplex virus 2 by experimental infection in vivo with defined intertypic recombinants of a virulent HSV-2 X an avirulent HSV.

Med. Microbiol. Immunol. **174**, 237-248.

RÖSEN A., F. ERNST, H.G. KOCH, H. GELDERBLOM, G. DARAI, J. HADAR, E. TABOR, T. BEN-HUR, Y. BECKER, 1986:

Replacement of the deletion in the genome (0.762-0.789 mu) of avirulent HSV-1 HFEM using cloned MluI dna fragment (0.7165-0.795 mu) of virulent HSV-1 F leads to generation of virulent intratypic recombinant.

Virus Res. **5**, 157-175.

SABINE M., G.R. ROBERTSON, J.M. WHALLEY, 1981:

Differentiation of sub-types of equine herpesvirus 1 by restriction endonuclease analysis.

Austr. Vet. J. **57**, 148-149.

SAXEGAARD F., 1966:

Isolation and identification of equine rhinopneumonitis virus (equine aborton virus) from cases of abortion paralysis.

Nord. Vet. Med. **18**, 504-512.

SCHEID A., P.W. CHOPPIN, 1974:

Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins.

Activation of cell fusion, hemolysis and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of sendai virus.

Virology **57**, 475-490.

SHIMIZU T., R. ISHIZAKI, S. ISHII, Y. KAWAKAMI, R. KAJI, K. SUGIMURA, M. MATUMOTO, 1959:

Isolation of equine abortion virus from natural cases of abortion in horse kidney cell culture.

Japan. J. Exp. Med. **29**, 643-649.

- SOEHNER R.L., G.A. GENTRY, C.C. RANDALL, 1965:
Some physiochemical properties of equine abortion virus nucleic acid.
Virology **26**, 394-405.
- SOUTHERN E., 1975:
Deletion of specific sequences among dna fragments separated by gel electrophoresis.
J. Molec. Biol. **98**, 503-517.
- SOVINOVA O., N.B. TUMOVA, F. POUSKA, J. NEMEC, 1958:
Isolation of a virus causing respiratory disease in horses.
Acta Virol. **2**.
- STUDDERT M.J., 1983:
Restriction endonuclease DNA fingerprinting of respiratory, foetal and perinatal foal isolates of equine herpesvirus type 1.
Arch. Virol. **77**, 249-258.
- STUDDERT M.J., D.R. FITZPATRICK, G.F. BROWNING, A.A. CULLINANE, J.M. WHALLEY, 1986:
Equine herpesvirus genomes: heterogeneity of naturally occurring type 4 isolates and of a type 1 isolate after heterologous cell passage.
Arch. Virol. **91**, 375-381.
- STUDDERT M.J., T. SIMPSON, B. ROIZMAN, 1981:
Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases.
Science **214**, 562-564.
- STUDIER F.W., 1973:
Analysis of bacteriophage 77 early rna and protein on slab gels.
J. Molec. Biol. **79**, 237-248.
- THEIN P., 1981:
Infection of the central nervous system of horses with equine herpesvirus serotype 1.
J. S. Afric. Vet. Ass. **52**, 239-241.
- TURTINEN L.W., G.P. ALLEN, R.W. DARLINGTON, J.T. BRYANS, 1981:
Serologic and molecular comparisons of several equine herpesvirus type 1 strains.
Amer. J. Vet. Res. **42**, 2099-2104.

VLAZNY D.A., A. KWONG, N. FRAENKEL, 1982:

Site specific cleavage/packaging of herpes simplex virus dna and the selective maturation of nucleocapsids containing full length viral dna.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 1423-1427.

WHALLEY J.M., G.R. ROBERTSON, A.J. DAVISON, 1981:

Analysis of the genome of equine herpesvirus type 1: arrangement of cleavage sites for restriction endonucleases EcoRI, BglII and BamHI.

J. gen. Virol. **57**, 307-323.

Lebenslauf

Am 18. Januar 1958 wurde ich, Carolin Schwend, als Tochter von Emil Schwend und seiner Frau Erika, geb. von Pastau, in Schwäbisch Hall geboren.

1964 bis 1968	Grundschule in Schwäbisch Hall
1968 bis 1977	Besuch der Gymnasien in Schwäbisch Hall, Öhringen und Künzelsau
6.05.1977	Abitur am Ganerben-Gymnasium Künzelsau
1977 bis 1978	Studium der Landwirtschaft an der University of British Columbia in Vancouver, Kanada
1978 bis 1980	Ausbildung zur Tierärzthelferin in Schwäbisch Hall
1980 bis 1981	Beschäftigt in einer Tierärztlichen Praxis in Schwäbisch Hall
1981 bis 1986	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
4.12.1986	Staatsexamen
Januar 1987	Beginn der vorliegenden Arbeit
16.07.1987	Approbation als Tierärztin

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Peter Hübert für seine wertvollen Anregungen und die immer freundlich gewährte, unermüdliche Hilfe bei der vorliegenden Arbeit und beim Einstieg in die Molekularbiologie.

Beim Erlernen von Grundtechniken war mir Frau Sylvia Schlabitz eine große Hilfe.

Allen Mitgliedern der Isolierstation, insbesondere Herrn Dr. Werner Eichhorn und Herrn Dr. Hermann Meyer, möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stete Unterstützung danken.

Zuletzt gilt mein Dank auch Oskar und meiner Familie für ihre Geduld und den seelischen Beistand bei der vorliegenden Arbeit.

